

Aus der Abteilung für Gastroenterologie
Zentrum für Innere Medizin
der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. Georg Lamprecht

**Einfluss von Vitamin D auf die Zytokinexpression
bei mononukleären Zellen des peripheren Blutes
aus gesunden Kontrollen und Patienten mit Morbus Crohn**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Hannes Hollborn
geb. am 21.05.1993 in Leipzig
aus Flensburg

Rostock, März 2020
Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

Gutachter: PD Dr. med. habil. M. Löbermann
Zentrum für Innere Medizin
Universität Rostock

PD Dr. H. Schäffler
Zentrum für Innere Medizin
Universität Rostock

PD Dr. A. Aghdassi
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
Universität Greifswald

Tag der Einreichung: 16.03.2020

Tag der Verteidigung: 02.02.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Morbus Crohn.....	1
1.2 Pathologie.....	2
1.3 Ätiologie und Pathogenese	3
1.3.1 Mikrobiom	3
1.3.2 Mukosales Immunsystem.....	3
1.3.3 Genetik.....	5
1.3.3.1 NOD2	5
1.3.4 Umweltfaktoren – Vitamin D	8
1.3.4.1 Bedarf und Vorkommen	8
1.3.4.2 Bildung, Aufnahme und Metabolismus von Vitamin D	10
1.3.4.3 Biologische Funktion	11
1.3.4.4 Vitamin D und Morbus Crohn	12
1.3.5 Diagnostik und Therapie von Morbus Crohn	15
1.4 PBMC-Modell	17
1.5 Zielstellung der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Materialien und Geräte.....	19
2.1.2 Chemikalien	20
2.1.3 Medien	21
2.1.4 Kits	21
2.1.5 Primer für die qPCR.....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Patienten und gesunde Kontrollen	22
2.2.2 Blutentnahme	23
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	23
2.2.3.1 Isolation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) ...	23
2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl	24
2.2.3.3 Einfrieren der Zellen	24
2.2.3.4 Zellkultur.....	25
2.2.3.5 Zellstimulation	25
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.3.1 RNA-Isolation und DNase-Behandlung	26
2.3.2 Quantifizierung der RNA	27
2.3.3 RNA-Agarosegelelektrophorese	27
2.3.4 cDNA-Synthese	28
2.3.5 Taqman Real-Time-PCR.....	29
2.3.6 <i>NOD2</i> -Genotypisierung	30
2.4 Proteinchemische Methoden	31

2.4.1	Bead-basierte Multiplexanalyse (LEGENDplex Methode)	31
2.4.2.	Durchflusszytometrie	32
2.4.2	ELISA	32
2.5	Statistik	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Genexpression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in PBMCs aus gesunden Kontrollen und MC-Patienten	34
3.1.1	Genexpression von IL-1 β bei HC und MC	34
3.1.2	Genexpression von IL-6 bei HC und MC-Patienten	36
3.1.3	Genexpression von TNF- α bei HC und MC-Patienten	38
3.1.4	Genexpression von IL-10 bei HC und MC-Patienten	40
3.2	Vergleich der Wirkung von Vitamin D auf die PBMCs aus HC und MC-Patienten ...	42
3.2.1	Wirkung von Vitamin D auf die Genexpression von IL-1 β bei HC und MC- Patienten	42
3.2.2	Wirkung von Vitamin D auf die Genexpression von IL-6 bei HC und MC- Patienten	43
3.2.3	Wirkung von Vitamin D auf die Genexpression von TNF- α bei HC- und MC- Patienten	44
3.2.4	Wirkung von Vitamin D auf die Genexpression von IL-10 bei HC und MC- Patienten	46
3.3	Einfluss von homo- bzw. heterozygoten <i>NOD2</i> -Mutationen	48
3.3.1	IL-1 β mRNA Expression	48
3.3.2	IL-6 mRNA Expression	49
3.3.3	IL-10 mRNA Expression	50
3.4	Proteinexpression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in PBMC von HC Kontrollen und MC-Patienten	51
3.4.1	Einfluss von Vitamin D auf die IL-6 Proteinsekretion bei HC und MC-Patienten	51
3.4.2	IL-10 Proteinsekretion und Wirkung von Vitamin D bei HC und MC-Patienten	52
3.4.3	Wirkung von Vitamin auf die TNF- α Proteinsekretion bei HC und MC-Patienten	54
3.4.4	Wirkung von Vitamin D auf die IFN- γ Proteinsekretion bei HC und MC- Patienten	56
4	Diskussion	57
4.1	Genexpression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in PBMC von gesunden Kontrollen und Morbus Crohn Patienten	58
4.1.1	Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in Morbus Crohn Patienten	59
4.1.2	Proteinsekretion pro-inflammatorischer Zytokine	60
4.1.3	IL-10 Expression und Sekretion in Morbus Crohn Patienten	62
4.2	Einfluss von Vitamin D auf das Zytokinprofil in PBMCs von gesunden Kontrollen und MC-Patienten	64
4.3	<i>NOD2</i> Mutationen	69
4.4	Kritische Betrachtung	70

4.5 Ausblick.....	71
5. Zusammenfassung.....	73
6. Thesen.....	76
7. Literaturverzeichnis	78
8. Anhang.....	96
a. Abbildungsverzeichnis	96
b. Tabellenverzeichnis	97
c. Selbstständigkeitserklärung.....	98
d. Danksagung	99
e. Lebenslauf	100

Abkürzungsverzeichnis

1,25-(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxycholecalciferol
25(OH)D ₃	25-Hydroxycholecalciferol
5-ASA	5-Aminosalizylat
7-DHC	7-Dehydrocholesterol
Abb.	Abbildung
ATD	<i>acidic transactivation domain</i>
AI	<i>Adequate Intake</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BIR	<i>Baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat domain</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C2TA	<i>MHC class 2 transcription activator</i>
CDAI	Crohn's Disease Activity Index,
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CARD	<i>caspase-recruitment domain</i>
CT	Computertomographie
CU	Colitis ulcerosa
CYP2R1	Vitamin D-25-Hydroxylase
CYP24A1	24-Hydroxylase
CYP27B1	25(OH)D-1 α -Hydroxylase
CYP24A1	25-hydroxyvitamin D(3)-24-hydroxylase
DAMP	<i>danger-associated molecular patterns</i>
DBP	Vitamin D bindendes Protein
DD	Dünndarm
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ECCO	<i>European Crohn's and Colitis Organisation</i>

FIIND	<i>function to find domain</i>
EAR	<i>Estimated Average Requirement</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
HC	<i>healthy control</i>
HET-E	<i>incompatibility locus protein from Podospora anserina</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IFN	Interferon
KHK	Koronare Herzkrankheit
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
MC	Morbus Crohn
MDP	Muramyl-Dipeptid
min	Minute
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
MT	<i>NOD2-Mutationsträger</i>
μl	Mikroliter
NACHT	Proteindomäne aus NAIP, C2TA, HET-E und TP1
NAIP	<i>neuronal apoptosis inhibitor protein</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NLR	<i>NOD-like-Rezeptor</i>
nm	Nanometer
NOD	<i>nucleotide-binding and oligomerisation domain</i>
OR	<i>odds ratio</i>

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P3C	Pam3Cys (synthetischer TLR2 Ligand)
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>periphal blood mononuclear cell</i>
PGN	Peptidoglycan
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PRR	<i>pathogen recognition receptors</i>
PTH	Parathormon
PYD	<i>pyrin domain</i>
rDNase	rekombinante Desoxyribonuklease
RDA	<i>Recommended Dietary Allowance</i>
RR	<i>relative risk</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	Real-Time PCR
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
T _H	T-Helfer-Zellen
TLR	<i>toll like receptor</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TP1	<i>telomerase-associated protein 1</i>
TUL	<i>tolerable upper level</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VDBP	Vitamin D bindendes Protein
VDR	Vitamin D Rezeptor
Vit	Vitamin
UV	ultraviolett
UVB	Ultraviolettstrahlung im Bereich 280 – 315 nm
WT	<i>NOD2</i> Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

1 Einleitung

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind die beiden wichtigsten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Die Ursachen der CED sind multifaktoriell, was darauf hinweist, dass zwar diverse Risikofaktoren bereits bekannt sind, die Ätiologie aber zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht völlig aufgeklärt ist. Das komplexe Zusammenspiel genetischer, mikrobieller und Umweltfaktoren begünstigt Prozesse, die zu einer Dysregulation des Immunsystems der Mukosa führen (Shouval und Rufo, 2017; Neurath, 2014).

In Europa leiden 2,5 Millionen und in den USA mehr als 1 Million Menschen an CED (Degenhardt und Franke, 2017). Für Deutschland liegt die Inzidenz bei bis zu 6,6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Ott et al., 2008). Die höchste altersspezifische Inzidenz tritt in der dritten Lebensdekade mit einem medianen Alter für Neuerkrankungen von 33 Jahren auf (Loftus et al., 2007). Anhand einer europaweiten Studie beschreiben Shivananda et al. (1996) ein Nord-Süd-Gefälle bei der Inzidenz von MC. Die Prävalenz schätzt man auf 100 - 200 pro 100.000 Einwohner (Timmer A., 2009). Inzidenz und Prävalenz von MC stiegen in den letzten Jahren an (Molodecky et al., 2012). Dafür werden der Lebensstil und die Ernährungsgewohnheiten (viel tierisches Fett und Protein, viel Zucker, wenig Getreide) in den industrialisierten Ländern sowie in Schwellenländern wie China oder Indien verantwortlich gemacht (Martinez-Medina et al. 2014, Hou et al., 2011).

Somit wird deutlich, dass CED zu steigenden Kosten führen und damit eine zunehmende Belastung für Gesundheitssysteme darstellen werden (Kaplan, 2015), was die Relevanz für die intensive Erforschung der Pathophysiologie der Erkrankung begründet.

1.1 Morbus Crohn

Krankheitsbilder, die mit dem heutigen Kenntnisstand auf MC hinweisen, wurden schon von Hippokrates erwähnt (Martini, 1991). Forscher des New Yorker Mount Sinai Hospitals publizierten 1932 einen Artikel, in dem 14 Fälle von entzündlichen granulomatösen Darmerkrankungen aus den Jahren 1925 bis 1930 ausführlich beschrieben wurden (Crohn et al., 1932; 1984; 2000; Aufses, 2000; Bernstein et al., 1999). Mit diesem Artikel wurde dem MC eine eigenständige pathologische Entität zugeordnet.

1.2 Pathologie

MC (Ileitis terminalis, Enteritis regionalis) ist eine diskontinuierlich verlaufende, durch Krankheitsschübe und symptomlose Remissionsphasen gekennzeichnete Erkrankung. Sie kann den gesamten Gastrointestinaltrakt von der Mundschleimhaut bis zum Anus befallen. Der Befall extraintestinaler Organe (Haut, Leber, Augen, Gelenke) ist ebenfalls möglich. Am häufigsten sind der untere Dünndarm (terminales Ileum) mit 25 - 40%, der Dickdarm (Colon) mit 15 - 35% und in 40 - 55% der Fälle Ileum und Kolon betroffen (Farmer et al., 1975; Harrison, 2005).

Zu den klinischen Symptomen zählen heftige bis krampfartige Unterbauch-, bzw. diffuse Bauchschmerzen und meist nichtblutige Diarrhoe, teilweise begleitet von Fieber, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Veränderungen an Haut und Augen sowie Müdigkeit (Stange et al., 2006, Hoffmann et al., 2008).

Die Erkrankung ist vom histopathologischen Aspekt gekennzeichnet durch eine transmurale, granulomatöse, ulzeröse, fibrosierende Inflammation des Gastrointestinaltraktes. In den betroffenen Gebieten kann es zu Stenosierungen, zu Fistelbildungen und intra-abdominalen, subkutanen Abszessen oder Konglomerattumoren kommen. Stenosierungen können konsekutiv zu Passagestörungen führen (Fischer et al., 2018). Die Montreal-Klassifizierung (Tabelle 1) bildet die Grundlage zur Beurteilung der Krankheitsaktivität. Bisher gilt der Morbus Crohn als unheilbar.

Tabelle 1: Montreal-Klassifizierung von Morbus Crohn nach Silverberg et al. (2005)

	Einteilung	Alter und Ausbreitung
Alter bei Diagnosestellung	A1	<16 Jahre
	A2	17 - 40 Jahre
	A3	>40 Jahre
Befallsmuster	L1	Ileum
	L2	Kolon
	L3	Ileum + Kolon
	L4	Oberer Gastrointestinaltrakt
Krankheitsverhalten	B1	Nichtstenosierend, nichtpenetrierend
	B2	Stenosierend
	B3	Penetrierend
	B3p	Perianale Erkrankung

1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die genauen Ursachen für die Entstehung von MC sind trotz intensiver Forschung nach wie vor nicht komplett verstanden. Insgesamt scheint eine fehlgerichtete mukosale Immunantwort, getriggert durch die kommensale mikrobielle Zusammensetzung bei genetisch prädisponierten Individuen die Entstehung der Erkrankung hervorzurufen. MC wurde in der Vergangenheit zu- meist als eine Autoimmunerkrankung klassifiziert. Deshalb befasste sich die Forschung der letzten Dekaden maßgeblich mit der Dysregulation spezifischer Abwehrmechanismen und der T-Zell-Polarisation. Da allein durch diese Aspekte die Pathogenese nicht vollständig geklärt werden konnte, geht man heute davon aus, dass die Dysregulation der Abwehrmechanismen eher die Konsequenz als die Ursache der entzündlichen Darmerkrankungen ist (Jäger et al., 2013).

1.3.1 Mikrobiom

Die Mikrobiota des Darms und das intestinale Immunsystem stehen in einem komplexen Gleichgewicht (Abb. 1). Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota, der Funktion der Darmschleimhaut, des Immunsystems und eine genetische Prädisposition können eine un- kontrollierte Immunreaktion begünstigen. Alhagamhmad et al. (2016) geben einen Überblick über die Rolle von Bakterien bei der MC-Pathogenese, wobei bisher kein einzelner spezifischer Mikroorganismus identifiziert werden konnte, welcher für die Entstehung verantwortlich ge- macht werden konnte. Beschrieben ist u.a. die Abnahme potenziell benefizieller Bakterien wie *Bifidobacterium* und diverse *Lactobacillus* Spezies und die Zunahme pathogener Bakterien wie *Escherichia coli* (Barnich und Darfeuille-Michaud, 2007). Vielmehr finden sich bei MC-Pati- enten eine veränderte intestinale bakterielle Komposition (Dysbiose) sowie eine verringerte Diversität (Baumgart und Sandborn 2012; Nagalingam und Lynch 2012; Satokari 2015; Schöff- ler et al., 2016a, 2016b). Ob dies jedoch Ursache oder Folge der mukosalen Inflammation ist, ist weiterhin Gegenstand aktueller Studien.

1.3.2 Mukosales Immunsystem

Die immunologische Dysregulation ist charakterisiert durch eine Schädigung des Epithels mit abnormaler Schleimproduktion und gestörten Reparaturmechanismen sowie durch eine Ent- wicklung und Ausweitung von Entzündungen. Ursächlich damit verbunden sind die Darmflora

und infiltrierende Zellen des Immunsystems wie T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen. Zudem ist die Regulation der Immunreaktionen beeinträchtigt oder fehlt ganz. (deSouza und Fiocchi, 2016; Korzenik und Podolsky, 2006; Ince und Elliott, 2007; Guan und Zhang, 2017) (Abb. 1).

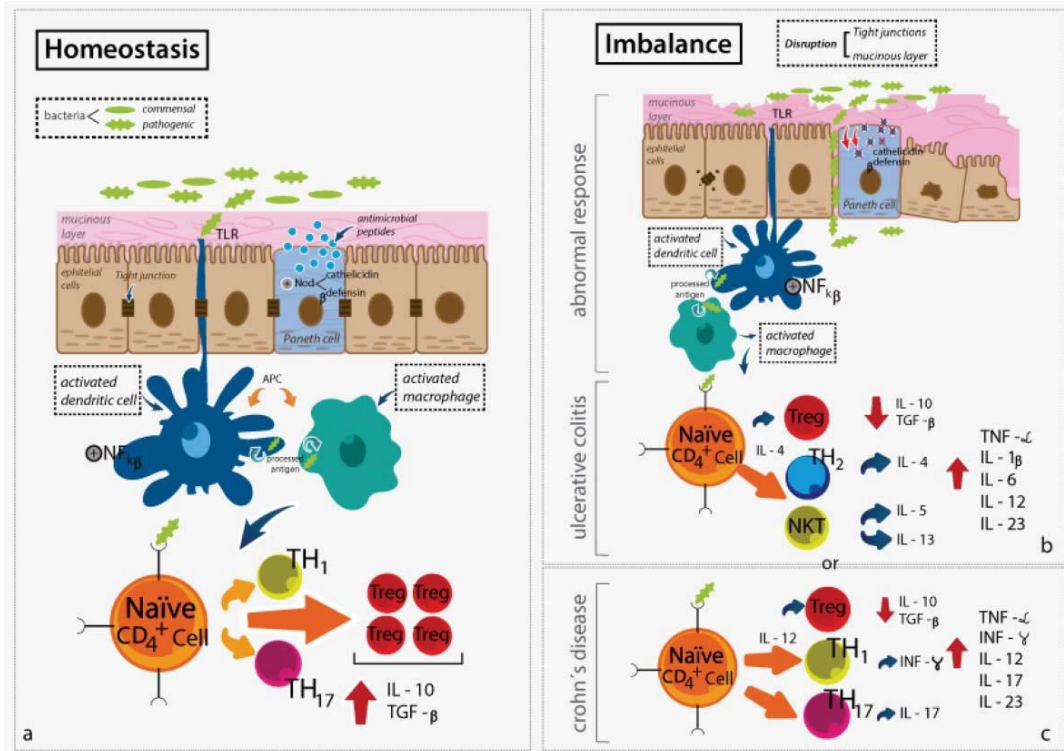


Abbildung 1: Schematische Darstellung aktiver inflammatorischer Wege bei Homöostase und CED
(a) Homöostase: Eine Immunantwort ist vorhanden. TLR-Rezeptoren erkennen Mikroorganismen. Über NF-κB Aktivierung wird die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen induziert. Herstellung des physiologischen Gleichgewichts durch regulatorische T-Zellen und Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10, TGF-β). (b und c) Imbalance: Bei Störungen der *tight-junctions* und/oder der Schleimschicht dominiert die Immunantwort. Panethzellen produzieren weniger anti-mikrobielle Proteine (Cathelicidin, Defensine). TH2-Zellen (CU) und TH1- und TH17- Zellen (MC) sezernieren verstärkt inflammatorische Zytokine.

TLR: *toll like receptor*; TH: T-Helfer-Zellen; NKT: natürliche Killerzellen; IL: Interleukin, TGF-β: transformierender Wachstumsfaktor β; NF-κB: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*. IFN-γ Interferon γ. [Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis aus: Barbalho et al. (2017)]

Diese immunkompetenten Zellen sezernieren eine Vielzahl von Faktoren, z.B. pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)-α, Interferon (IFN)-γ, und Vertreter der Interleukin (IL)-1- und IL-12 Familie sowie anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und transformierender Wachstumsfaktor β (TGF-β) (deSouza und Fiocchi, 2016; Neurath 2014, Guan und Zhang, 2017). Diese Zytokine übernehmen eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese von MC und sind bzw. könnten perspektivisch gleichzeitig Ziele potenzieller therapeutischer Maßnahmen werden (Chen und Sundrud, 2016).

1.3.3 Genetik

Die Rolle genetischer Faktoren wird durch ein erhöhtes familiäres Vorkommen, aber auch durch hohe Inzidenzraten bei bestimmten Ethnien belegt (Del-Gaudio et al., 1999). Eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) identifizierte 163 Genloci, die mit CED in Verbindung stehen. 30 davon gelten als spezifisch für MC (Jostins et al. 2012).

Als erstes Risikogen für die Entstehung von ilealem MC wurde das *nucleotide-binding oligomerisation domain 2 (NOD2)*-Gen identifiziert (Ogura et al., 2001; Hugot et al., 2001).

NOD2 wird von antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Zellen) aber auch von den Panethzellen des terminalen Ileums und Darmepithelzellen exprimiert (Lala et al., 2003, Hisamatsu et al., 2003). Panethzellen spielen eine wichtige Rolle bei der angeborenen Regulation der Darm-Mikrobiota durch die Synthese und Sekretion von antimikrobiellen Peptiden und Proteinen wie Lysozym, sekretorische Phospholipase A2 sowie der alpha-Defensine 5 und 6 in das Darmlumen (Stange et al., 2005; Wehkamp et al., 2005, Williams et al., 2017). Damit könnte *NOD2* auch ein Regulator der Mikrobiota des Darmes sein (Petnicki-Ocwieja et al., 2009; Rehman et al., 2011; Schäffler et al., 2016b).

Im Zusammenhang mit MC ist *NOD2* inzwischen das am besten charakterisierte Gen (Ogura et al., 2001; Hugot et al., 2001). *NOD2* Mutationen wie Gly908Arg (G908R), Arg702Trp (R702W) oder L1007fs sind eng verbunden mit der Entstehung und mit Komplikationen bei MC (Bonen et al., 2003b; Economou et al., 2004). Heterozygote *NOD2*-Varianten erhöhen das MC-Risiko 2 - 4 fach und homozygote *NOD2*-Varianten 20 - 40 fach (Hugot et al., 2007).

1.3.3.1 NOD2

NOD2 spielt eine Rolle bei der Abwehr invasiver intrazellulärer Pathogene (Kobayashi et al., 2005). Dabei ist es an der Initiierung der Genexpression inflammatorischer Faktoren über eine Aktivierung des NF-κB Signalweges beteiligt (Hruz et al., 2009; Dickson, 2016). Der NF-κB Signalweg reguliert unter anderem die angeborene als auch die adaptive Immunantwort (Li und Stark, 2002). *NOD2* gehört zur *NOD-like-Rezeptor (NLR)* Familie, die zu den *pathogen recognition receptors (PRRs)* und damit zur angeborenen Immunabwehr zählen. Zu den PRRs zählen auch membranständige *toll like receptors (TLR)*. Die NLRs sind aus 3 Domänen mit sich unterscheidenden N-terminalen Effektordomänen aufgebaut (Abb. 2).

(Ogura et al., 2001; Hugot et al. 2001). Ursachen könnten die Unfähigkeit der PGN-Bindung, eine fehlende Initiation der Immunantwort oder die Proteininstabilität sein (Mohan and Grimes, 2014).

Von den 852 identifizierten *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) des humanen *NOD2*-Gens werden 3 Bestimmte mit der Morbus Crohn Erkrankung assoziiert. Dies sind daher auch jene, die in dieser Arbeit betrachtet wurden. Hierbei handelt es sich um SNP 8 [2104C>T, Arg702Trp], SNP 12 [2722G>C, Gly908Arg], sowie SNP 13 [3020insC, Leu1007 fsins C]. Diese Mutationen im *NOD2*-Gen verursachen Defekte im Bereich der *leucine-rich repeat* (LRR)-Domäne, was zu einer reduzierten Affinität zu den bakteriellen Liganden führt. So bindet der NOD2-Rezeptor mit einer SNP 13 Mutation zwar LPS, aber kein MDP. Das NF- κ B-Signaling spielt dabei eine maßgebliche Rolle (Abb. 3) (Bonen und Cho, 2003; Inohara und Nunez, 2003).

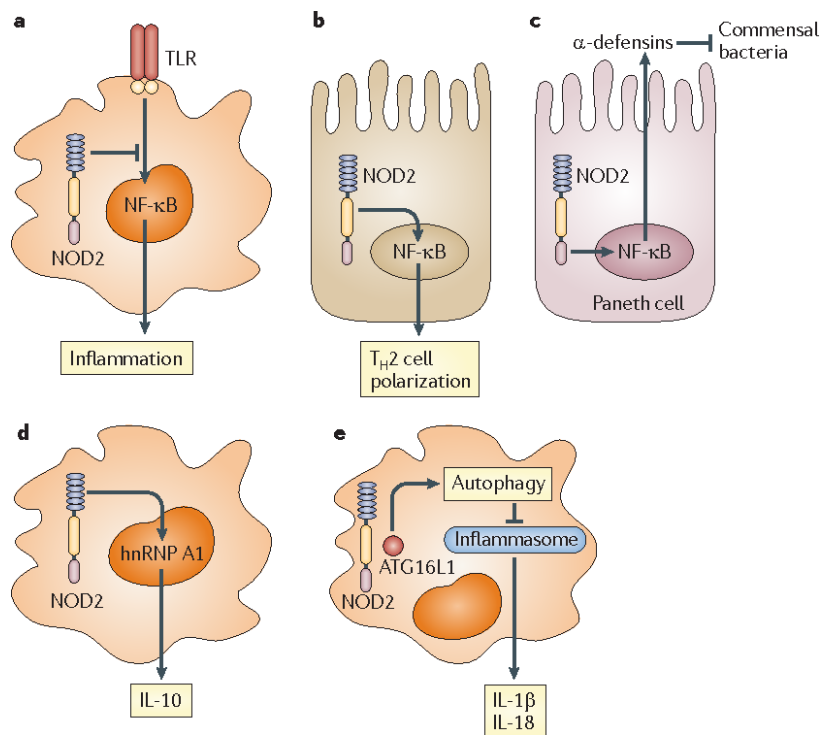


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mechanismen der Funktion von NOD2

Abbildung aus Saleh und Trinchieri (2011) [Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Nature Reviews Immunology; Lizenznummer: 47125009420169].

Eine fehlende Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führt zu einer verminderten Sekretion von Defensinen und pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF, IL-1 β , IL-18) und somit zu einer reduzierten Immunantwort der Dünndarmzellen (Beynon et al., 2008; Wehkamp et al., 2004). Trotzdem treten bei MC-Patienten durch eine erhöhte NF- κ B Aktivität vermehrt inflammatori-

sche Prozesse auf. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der gestörten Abwehr invasiver Bakterien, die über einen NOD2 unabhängigen Signalweg eine verstärkte Immunantwort verursachen (Sartor, 2006; Frosali et al., 2015). Die verringerte Sekretion von Defensinen könnte dabei eine bedeutende Rolle spielen.

Eine weitere Erklärung hierfür ist, dass NOD2 die Aktivierung von NF- κ B über Liganden des TLR2 moduliert (Strober et al. 2006). PGN stimuliert NF- κ B bei Makrophagen über TLR2. PGN wird danach von den Endosomen aufgenommen und zu MDP abgebaut, das abgegeben wird und NOD2 stimuliert. Das wiederum hemmt das TLR2 Signaling. Das Fehlen dieser Regulation im Falle von mutiertem *NOD2* führt zur erhöhten Produktion von inflammatorischen Faktoren wie IL-12 und IL18 und damit zur Ausbildung von pathologischen Veränderungen (Abb. 4).

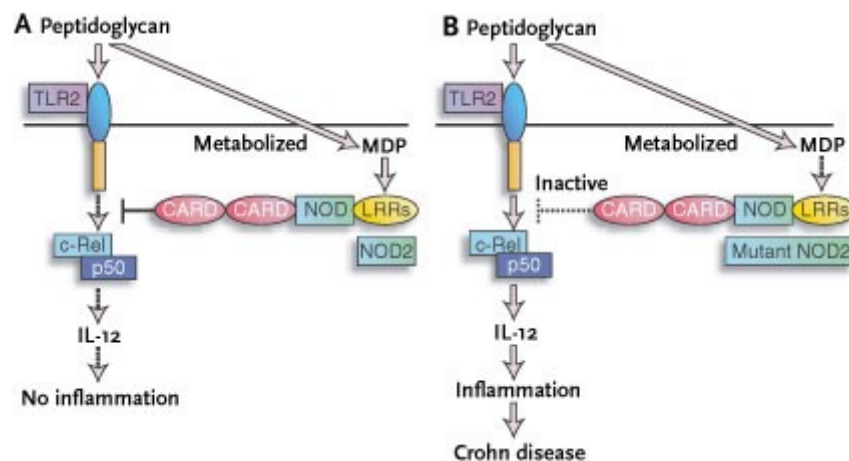


Abbildung 4: Mutiertes *NOD2* ist nicht in der Lage die Aktivität des TLR2 zu hemmen

A) Von MDP aktiviertes, zytosolisches NOD2 hemmt das an der Zelloberfläche durch PGN aktivierte TLR2 Signalling mit Effekten auf die NF- κ B Aktivierung und inflammatorische Prozesse. B) Ein, durch ein mutiertes *NOD2* Gen, fehlerhafter NOD2 Rezeptor bei MC-Patienten kann MDP nicht erkennen, wodurch der TLR2-Signalweg nicht gehemmt wird und inflammatorische Faktoren verstärkt gebildet werden. Abbildung aus: O'Neill (2004) [Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Nature Reviews Immunology; Lizenznummer: 4712500675972]

1.3.4 Umweltfaktoren – Vitamin D

1.3.4.1 Bedarf und Vorkommen

Vitamin D ist die Bezeichnung für eine Gruppe fettlöslicher Vitamine, die chemisch den Steroiden zuzuordnen sind. Es handelt sich hierbei um kein echtes Vitamin, da es vom Körper auch selbst produziert wird.

Etwa 80-90% des Vitamin D Bedarfs werden durch die Sonnenlicht-induzierte körpereigene Synthese gedeckt. Dabei kann die Haut bis zu 25.000 IE Vitamin D/Tag durch UVB-

Strahlen synthetisieren (Reich et al., 2014). Ein geringer Teil kann mit der Nahrung aufgenommen werden, wobei tierische Nahrungsmittel (Lebertran, Fisch) den größten Gehalt an Vitamin D₃ aufweisen. Pflanzliche Nahrungsmittel wie Avocados und Pilze enthalten hauptsächlich Vitamin D₂ (Ergocalciferol) (Holick, 2006).

In den eher sonnenreichen Monaten März bis Oktober genügen 5 - 25 min Sonnenexposition am Tag, damit der eigene Körper ausreichend Vitamin D produziert und gleichzeitig noch ein Depot für die sonnenarmen Wintermonate anlegt (DGE, 2012). In Tabelle 2 ist der Tagesbedarf von Vitamin D angegeben. Mit der zunehmenden Popularität von Nahrungsergänzungsmitteln gewinnt der *Tolerable Upper Level* (TUL)-Wert an Relevanz. Er beschreibt die höchste tägliche Zufuhrmenge eines Nahrungsbestandteils ohne nachteiligen Einfluss auf die Gesundheit der Gesamtbevölkerung.

Tabelle 2: Tagesbedarf an Vitamin D in Abhängigkeit des Alters und des Geschlechtes aus: IOM Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D (2011).

Altersgruppe	AI	EAR	RDA	TUL
Kleinkinder				
0 – 6 Monate	400 IE (10 µg)	-	-	1.000 IE (25 µg)
6 – 12 Monate	400 IE (10 µg)	-	-	1.500 IE (38 µg)
Kinder				
1 – 3 Jahre	-	400 IE (10 µg)	600 IE (15 µg)	2.500 IE (63 µg)
4 – 8 Jahre	-	400 IE (10 µg)	600 IE (15 µg)	3.000 IE (75 µg)
Männer				
9 – 70 Jahre	-	400 IE (10 µg)	600 IE (15 µg)	4.000 IE (100 µg)
>70 Jahre	-	400 IE (10 µg)	800 IE (20 µg)	4.000 IE (100 µg)
Frauen				
9 – 70 Jahre	-	400 IE (10 µg)	600 IE (15 µg)	4.000 IE (100 µg)
>70 Jahre	-	400 IE (10 µg)	800 IE (20 µg)	4.000 IE (100 µg)
Schwangere und Stillende				
14 – 50 Jahre	-	400 IE (10 µg)	600 IE (15 µg)	4.000 IE (100 µg)

AI: *Adequate Intake*: experimentell ermittelte täglichen Zufuhrmenge, die ausreicht, den Bedarf zu decken

EAR: *Estimated Average Requirement*: ausreichende tägliche Zufuhrmenge, die den Bedarf von 50% der gesunden Personen einer definierten Bevölkerungsgruppe deckt

RDA: *Recommended Dietary Allowance*: ausreichende tägliche Zufuhrmenge, die den Bedarf von 98% der gesunden Personen einer definierten Bevölkerungsgruppe deckt

TUL - *Tolerable Upper Level*: höchste tägliche Zufuhrmenge von Nahrungsbestandteilen, die keinen nachteiligen Einfluss auf die Gesundheit der Gesamtbevölkerung hat.

Quelle: <http://www.ernaehrung.de/tipps/referenzwerte/referenz13.php>

1.3.4.2 Bildung, Aufnahme und Metabolismus von Vitamin D

Ca. 65% einer Vorstufe des Vitamin D₃ (7 Dehydrocholesterol - 7-DHC) befindet sich in der Epidermis der Haut (Esvelt et al. 1978). Deshalb und wegen deren hoher UVB-Penetration wird hier die Mehrheit an Vitamin D₃ gebildet, während in der Dermis mit 20% UVB-Penetration nur ca. 35% produziert werden (Abhimanyu und Coussens, 2017).

Die Wirkung der UVB-Strahlen öffnet die Bindung zwischen den C-Atomen C9 und C10 des B-Ringes im 7-DHC und es bildet sich das biologisch inaktive Prävitamin D₃ (Pre-Cholecalciferol). Bei längerer intensiver Einwirkung von UVB-Strahlung wird durch einen Schutzmechanismus eine Intoxikation an Vitamin D₃ verhindert. Prävitamin D₃ wird dann verstärkt in physiologisch inaktive Photoprodukte, wie Tachysterol und Lumisterol umgewandelt. Vitamin D₃ selbst ist labil gegenüber Sonnenlicht und wird dann zu unwirksamem Suprasterol 1 und -2 sowie zu 5,6-Trans-Vitamin D₃ abgebaut (Holick, 2007; 2004; Hossein-nezhad und Holick, 2013). Eine übermäßige Vitamin D-Substitution kann trotzdem zu einer Hypervitaminose D führen, die eine Hyperkalzämie mit Nieren- und kardiovaskulären Schädigungen begünstigen kann (DeLuca, 1974).

Durch eine wärmeinduzierte Isomerisierung entsteht aus dem instabilen Prävitamin D₃ das Vitamin D₃. Dieses wird über die Keratozyten-Membran abgegeben und gelangt durch Bindung an Vitamin-D-bindende Proteine (VDBP) über die Kapillaren der Haut in den Blutkreislauf und in die Leber (Holick et al., 1980; Holick, 1981; Holick, 2007a; Holick, 2004; DeLuca, 2014).

Mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin D wird im Dünndarm durch passive Diffusion resorbiert und in Lipoproteinen (Chylomikronen) über das Lymphsystem ins Blut transportiert (Haddad et al, 1993; Hossein-nezhad und Holick, 2012). Nach dem Abbau der Chylomikronen im Blut binden die Vitamine an VDBP und werden ebenfalls zur Leber transportiert. In der Leber erfolgt durch das Enzym Vitamin D-25-Hydroxylase (CYP2R1) eine Hydroxylierung am C25 (Abb. 5) (Cheng et al., 2004). Das dabei entstandene Produkt entspricht dem im Blut zirkulierenden inaktiven Vitamin D-Metaboliten, 25(OH)D₃ (25-Hydroxycholecalciferol). Seine Konzentration ist hoch und wird deshalb zur Bestimmung des Vitamin D Status bei Patienten verwendet (Hollis, 1996; Hollick, 2004). Außerdem unterscheiden sich die Halbwertszeiten der einzelnen Vitamin D-Metabolite deutlich. Für 25(OH)D₃ beträgt die Halbwertszeit bis zu 19 Tage, für Vitamin D nur einen Tag und für 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, dass in der Niere gebildet wird, nur einige Stunden (Smith und Goodman, 1977; Hollis und Wagner, 2013). CYP2R1

hat die höchste Affinität für Vitamin D. Defekte im Gen für CYP2R1 scheinen mit einer Vitamin D-Dysfunktion in Zusammenhang zu stehen (Al Mutair et al., 2012).

Vitamin D wird hauptsächlich in der Leber, aber auch in Fettgewebe gespeichert. An VDBP gebunden wird 25(OH)D₃ zu den Nieren transportiert. Dort erfolgt eine weitere Hydroxylierung durch die 25(OH)D-1 α -Hydroxylase (CYP27B1) zum biologisch aktiven 1,25-(OH)₂D₃ (1,25-Dihydroxycholecalciferol) (Bland et al., 2000; Hossein-nezhad und Holick, 2013). Mutationen im Gen für CYP27B1 verursachen die Vitamin D-abhängige Rachitis Typ 1 (Fu et al., 1997).

Durch Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR), der in vielen Geweben (z.B. Knochen, Niere, Darm und Immunzellen) exprimiert wird, beeinflusst es die Transkription von verschiedenen Zielgenen (Christakos et al., 2003, Pike und Meyer 2012, Hewison, 2012).

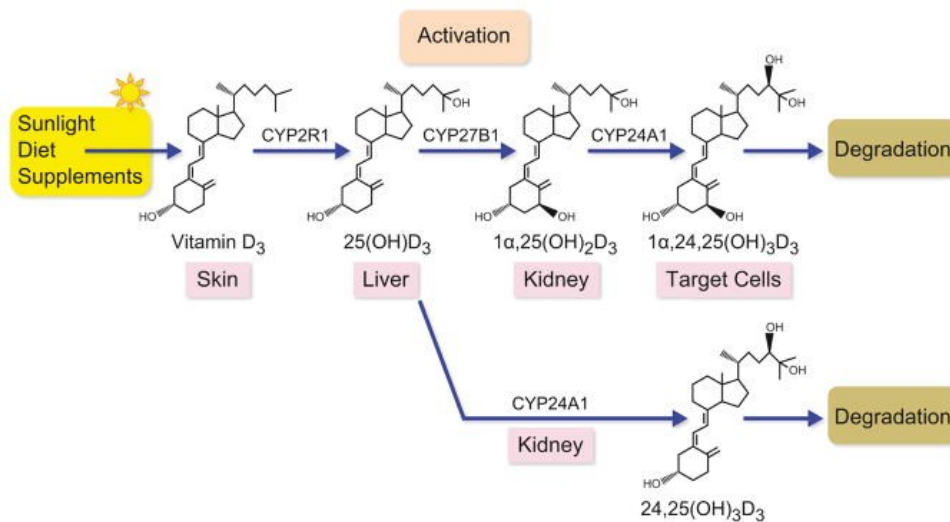


Abbildung 5: Aktivierung und Initiierung des Abbaus von Vitamin D₃

Vitamin D₃ aus der Haut wird in der Leber durch CYP2R1 zu 25(OH)D₃ umgesetzt. Aus 25(OH)D₃ entsteht in der Niere durch die CYP27B1 biologisch aktives 1,25(OH)₂D₃. In der Niere und in verschiedenen Zielorganen wird durch die Aktivität der CYP24A1 der Abbau von 1,25(OH)₂D₃ eingeleitet. Abbildung aus Pike und Christakos (2017) [Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier; Lizenznummer: 4712480596294].

1.3.4.3 Biologische Funktion

Zu den Zielorganen des Vitamin D zählen die Nieren, die Knochen, die Nebenschilddrüse, der Darm und auch das Immunsystem. 1,25(OH)₂D₃ ist wichtig für den Calcium- und Phosphat-Metabolismus der Knochen und die Kontrolle der Mineralhomöostase in Niere und Darm (Holick, 2007b; DeLuca et al. 1990). Es fördert die Resorption von Calcium und Phosphat im Darm und in den distalen Tubuli der Niere bewirkt es deren vermehrte Rückresorption (Sutton und MacDonald, 2003).

Da eine Vielzahl von Geweben und Zellen den VDR exprimieren, wird davon ausgegangen, dass Vitamin D noch weitere Prozesse beeinflusst. Schon früh wurde so zum Beispiel eine antiproliferative Wirkung von Vitamin D auf Krebszellen, welche den VDR exprimieren festgestellt (Colston et al., 1981).

Auch exprimieren Immunzellen den VDR und Enzyme, welche aktives Vitamin D produzieren können. Dadurch spielt Vitamin D auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des menschlichen Immunsystems. Durch Veränderungen der Wirkung aktivierter B- und T-Zellen kann die adaptive Immunantwort beeinflusst werden, während die angeborene Immunantwort durch die Regulation der Makrophagen und dendritischen Zellen moduliert werden kann (Guillot et al., 2013).

Hinzukommen antibakterielle Eigenschaften, welche durch die Autophagie-Induktion zur Eliminierung von Pathogenen beschrieben werden (Liu et al., 2006). Anti-inflammatorische Eigenschaften konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Müller et al., 1992, Khoo et al., 2011).

Aufgrund dieser mannigfaltigen immunmodulatorischen Wirkung wurde ein Mangel an Vitamin D in den letzten Jahren vermehrt mit der Pathogenese vieler autoimmuner und chronisch inflammatorischer Erkrankungen in Verbindung gebracht. So wurden unter anderem Assoziationen von niedrigen Serum Vitamin D-Spiegel mit Multipler Sklerose (Summerday et al., 2012), Artherosklerose (Cheraghi et al., 2012), sowie rheumatischer Erkrankungen (Shapira et al., 2010) und Morbus Crohn postuliert.

Der genaue Mechanismus hinter dem beobachteten Effekt eines Vitamin D Mangels und der Pathogenese dieser diversen Erkrankungen steht deshalb im Fokus der gegenwärtigen Forschung.

1.3.4.4 Vitamin D und Morbus Crohn

Ein Vitamin D Defizit wird in Verbindung mit der Pathogenese von CED gebracht (Ananthakrishnan et al., 2012; Ratfery et al., 2015a, Schäffler et al, 2018a, White, 2018). Jantchou et al. (2014) beschrieben einen Zusammenhang zwischen einer höheren Sonnenlicht-Exposition und einer geringeren Inzidenz für MC. Dies steht wahrscheinlich auch damit im Zusammenhang, dass die Inzidenz mit der Zunahme der Anzahl der Breitengrade steigt, was möglicherweise eine Assoziation zwischen Vitamin D Mangel und die Entstehung von CED nahelegen könnte (Khalili et al., 2012).

Die Rolle von Vitamin D bezüglich CED begrenzt sich nicht nur auf die Entstehung der Erkrankung. In einer Querschnittstudie zur Wechselbeziehung zwischen dem Vitamin D Spiegel und der Krankheitsaktivität konnten geringe Vitamin D Spiegel mit einer aktiven Krankheitsphase in Verbindung gebracht werden (Dias de Castro et al., 2015). In retrospektiven Studien zeigten Ko et al. (2018) und Ye et al. (2017) eine negative Korrelation zwischen Vitamin D Gehalt und Krankheitsaktivität bei MC-Patienten aus Korea und China.

Vitamin D hat dabei auf verschiedene Arten Einfluss auf die Pathogenese von Morbus Crohn. Als wichtige Angriffspunkte für eine protektive Rolle von Vitamin D werden hierbei die epitheliale Darmbarriere, die Darmimmunität und die Mikrobiota des Darms angesehen. (Gubatan und Moss, 2018).

So kommt es zu einer Stärkung der epithelialen Darmbarriere vor infektiösen und entzündlichen Schädigungen, was im Tiermodell und an humanen Colon-Zellen nachgewiesen wurde (Assa et al., 2015; Chen et al., 2015).

Wie bereits beschrieben beeinflusst Vitamin D auch die angeborene und die erworbene Immunität. Es konnte gezeigt werden, dass Vitamin D in Monozyten und Epithelzellen die Expression von *NOD2* und anti-mikrobiellen Peptiden (Defensine, Cathelicidine, Lysozym) stimuliert (Wang et al., 2010; Gombart et al., 2005; Lowry et al., 2014, Raftery et al. 2015b, 2015c; Schäffler et al., 2018b). Außerdem hemmt Vitamin D die T_H1 -, T_H17 -Zellen (Cantorna et al., 2015). Desweiteren ergaben Untersuchungen an MC-Patienten mit anti-TNF-Therapie, dass nach Vitamin D Behandlung die Proliferation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bei Respondern und auch Non-Respondern abnahm, wobei der Effekt bei den Respondern größer war (Stio et al., 2004).

Hinzu kommt der positive Einfluss von Vitamin D auf die Mikrobiota des Darms. Wichtig dabei ist die Aktivität des VDR (Wang et al., 2016). Fehlendes VDR-Signaling verursacht eine Dysbiose der Darmflora, die durch Applikation von Vitamin D reguliert werden kann (Jin et al., 2015, Ooi et al., 2013). Eine Studie konnte zeigen, dass die Vitamin D Applikation eine Veränderung der intestinalen bakteriellen Komposition bei MC-Patienten, jedoch nicht bei gesunden Probanden zur Folge hatte (Schäffler et al., 2018c).

Der Zusammenhang zwischen Vitamin D und CED konnte auch bereits breit im klinischen Rahmen nachvollzogen werden. Yang et al. (2013) fanden in einer prospektiven Studie mit 18 MC-Patienten, dass eine Erhöhung des Vitamin D Levels auf 45 ± 19 ng/ml eine Verringerung des „*CDAI score*“ im Durchschnitt um 112 Punkte zur Folge hatte. Bei Patienten mit aktiver CU verbesserte eine wöchentliche Gabe von 40.000 IE Vitamin D₃ über 8 Wochen Entzündungsmarker (fäkales Calprotectin, Thrombozytenzahl, Albumin) wobei die Diversität der

allgemeinen Microbiota unverändert blieb (Garg et al., 2018). Demnach reduziert Vitamin D die intestinale Entzündung unabhängig von der Zusammensetzung der Darmbakterien. Mechie et al. (2019) zeigten, dass MC-Patienten mit hohem Vitamin D Gehalt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Remission haben und dass der Vitamin D Gehalt ein nicht invasiver Marker zur Charakterisierung der Krankheitsaktivität darstellen könnte. Weitere prospektive Studien belegen Zusammenhänge zwischen geringem Vitamin D Spiegel und einer Erhöhung von Krankheits- und Inflammationsaktivität, Hospitalisationsrate, verstärkte Gesundheitsversorgung, vermehrten operativen Eingriffen, Versagen von anti-TNF-Therapie und Verschlechterung der Lebensqualität (Kabbani et al., 2016; Alrefai et al. 2017, Frigstad et al., 2017; Santos-Antunes et al., 2016).

Demgegenüber fanden jedoch Reich et al. (2016) in einer Studie bei Patienten mit moderatem bis schwerem MC, dass Patienten mit einem niedrigen Vitamin D Gehalt eine höhere klinische Remissionsrate aufwiesen als Patienten mit normalem Vitamin D Level. Einen Erklärungsansatz dafür gibt es bisher nicht.

Um ein genaueres Verständnis der immunmodulatorischen Effekte von Vitamin D in Morbus Crohn Patienten zu gewinnen, steht unter anderem auch die Wirkung auf Zytokine im Fokus der Forschung. In einer prospektiven Studie zum Vitamin D Status und dem entsprechenden Zytokin-Gehalt wurde bei MC-Patienten mit Vitamin D Defizienz signifikant weniger IL-10 gemessen als bei Probanden mit normalen Vitamin D Werten, während der TNF- α und CRP Gehalt sowie der *CDAI-score* gleich waren. Nach einer Gabe von 200 IE Vitamin D/Tag konnte kein signifikanter Einfluss auf den IL-10 Gehalt festgestellt werden (Kelly et al., 2011). Daneben gibt es zahlreiche Studien, in denen keine signifikanten Effekte bezüglich klinischer Rezidivrate, TNF- α -Level, Krankheitsaktivität oder Entzündungsparametern nach Vitamin D Behandlung festgestellt werden konnte (Jorgensen et al. 2010; Narula et al., 2017, Dadaei et al., 2015, Tan et al., 2018). Das zeigt, dass trotz intensiver Studien die Funktion von Vitamin D bei CED-Patienten noch nicht geklärt ist und sich für die Klinik und Diagnostik weitere Fragen stellen.

Weiterhin wurde eine signifikante Erhöhung des Vitamin D Gehaltes bei Patienten, die mit TNF- α Inhibitoren behandelt wurden, festgestellt (Schäffler et al, 2018a). Winter et al. (2017) beschreiben eine Abhängigkeit der Effekte von TNF- α Inhibitoren vom Vitamin D Status. Dabei reagierten Patienten mit normalen Vitamin D Werten besser auf eine Behandlung mit TNF- α Inhibitoren als Patienten mit einem Vitamin D Mangel.

Diese Ergebnisse unterstützen eine mögliche protektive Rolle von Vitamin D bei MC aufgrund der anti-proliferativen, anti-inflammatorischen und immunmodulierenden Eigenschaften. Raftery et al. (2015a) empfehlen für MC-Patienten die Aufnahme von 25 – 200 µg (1000 - 8000 IE) Vitamin D um eine wirksame Serumkonzentration von >75 nmol/l zu erreichen. Xia et al. (2019) untersuchten an einem Ratten Modell für MC die Wirkung von niedrig und hoch dosiertem Vitamin D. Sie fanden eine signifikant verringerte Krankheitsaktivität in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis, weil es durch die Hemmung des IL-17/IL-17R Signalweges die Chemotaxis und Differenzierung von T_H1-Zellen verbessert. Martin et al. (2019) untersuchten die Wirkung einer einmaligen Gabe an hoch dosiertem Cholecalciferol (Stoss) in einer Studie mit Kindern, die an MC oder CU erkrankt waren. Dabei konnten Serumkonzentrationen >75 nmol/l in allen Probanden nach 1 Monat sowie eine Verbesserung der Krankheitsaktivität und der Entzündungsmarker nachgewiesen werden. Symptome einer Vitamin D Toxizität traten nicht auf.

Aufgrund der beschriebenen Datenlage rückt eine adäquate Versorgung mit Vitamin D in den Fokus des therapeutischen Interesses. Es ist aber derzeit noch nicht vollständig geklärt, welchen Effekt eine Vitamin D Substitution bei MC-Patienten haben könnte.

Kritisch ist zu diesem Punkt anzumerken, dass es für die Studien derzeit keine festgelegten Standards gibt. Sie variieren bezüglich Definition für Vitamin D Defizienz, Studienteilnehmer und -design, Krankheitsaktivität, eingesetzter Behandlungsdosen, Behandlungsdauer und Therapieerfolg (Nielsen et al., 2019). Weiterhin gibt es keine standardisierte Methode zur Bestimmung des Vitamin D Gehaltes (Ebeling et al., 2018). Für eine bessere Vergleichbarkeit der Studien wäre für die Zukunft eine Standardisierung der untersuchten Parameter wünschenswert und unerlässlich.

1.3.5 Diagnostik und Therapie von Morbus Crohn

Eine Grundlage zur Diagnostik und Therapie bilden die internationale ECCO- bzw. die nationalen DGVS- oder AWMF-Leitlinien (Stange et al., 2006; Preiß et al., 2014). Wesentlich ist eine ausführliche Anamnese, mit Fragen zum Beginn, zu den Beschwerden und zu eventuellen Risikofaktoren. Neben laborchemischer und mikrobiologischer Diagnostik werden endoskopische und radiologische Untersuchungsmethoden eingesetzt (Baumgart, 2009; Gomollon et al., 2017). Anhand der Laborparameter ist eine sichere Differenzierung zwischen MC und CU nicht möglich. Folgende Analysen werden empfohlen (Baumgart, 2009, Fischer et al., 2018): Blutbild, Blutsenkungsreaktion, Entzündungsparameter, Leber- und Nierenwerte, Eisenstatus sowie Stuhl Diagnostik.

Bildgebende Verfahren bilden einen wichtigen Bestandteil für die Erstdiagnostik und die Verlaufskontrolle. Die Daten dieser Verfahren liefern wegweisende Hinweise für eine Differenzierung zwischen MC und CU. Angewandt werden unter anderem die Darmsonographie, die Endoskopie (Gastro- und Ileokoloskopie mit Histologie), die Magnetresonanztomographie (MRT) und in besonderen klinischen Situationen auch die Computertomographie (CT).

Ziel der Therapie sind eine Reduktion der Symptome sowie der Schutz vor Langzeitkomplikationen und damit eine Verbesserung der Lebensqualität. Hierfür werden medikamentöse und chirurgische Therapiestrategien aber auch Ernährungstherapien eingesetzt. Bei der medikamentösen Therapie unterscheidet man Strategien zur Behandlung der aktiven Erkrankung und dem Erhalt der Remission.

Bei einer milden Form von MC (Ileitis terminalis) wird die Behandlung mit dem Steroid Budesonid bzw. mit 5-Aminosalizylaten (5-ASA) wie Mesalazin oder Sulfasalazin begonnen. Bei schwerem MC oder therapierefraktären Verläufen wird auf systemische Kortikosteroide zurückgegriffen. Wegen ihrer Nebenwirkungen werden sie nur zur Remissionsinduktion eingesetzt (Fischer et al., 2018). Bei Nichtansprechen auf die Steroidtherapie können TNF- α -Antikörper (Infliximab, Adalimumab) zur Therapie herangezogen werden (Vetter und Neurath, 2018; Hanauer et al., 2002 [ACCENT I-Studie] Colombel et al., 2007, Sandborn et al., 2012 [CHARM Studie]). Die Wirksamkeit von Certolizumab, das in Deutschland nicht zugelassen ist, wurde in der PRECISE 2 Studie (Schreiber et al., 2007) nachgewiesen. Darüber hinaus konnte in diversen Studien ein positiver Effekt des Integrin ($\alpha 4\beta 7$) blockierenden Antikörpers Vedolizumab (GEMINI-1 und -2 Studien: Feagan et al., 2013, Sandborn et al. 2013, Wyant et al., 2016) gezeigt werden. Positive Wirkungen wurden auch für Ustekinumab (UNITI-Studien: Feagan et al., 2016; Sandborn et al. 2013, Deepak und Sandborn, 2017), welches IL-12 und IL-23 blockiert und somit deren Interaktion mit T_H1- und T_H17-Zellen unterbindet, gezeigt. Weiterhin werden Antibiotika (Metronidazol, Ciprofloxacin), Immunsuppressiva (Azathioprin, Cyclosporin, Methothrexat, Mercaptopurin) zur Behandlung von MC eingesetzt.

Ernährungstherapie wird bei einem akuten Schub vor allem bei pädiatrischen Patienten als totale parentrale Ernährung aber auch als enterale Formula-Diät eingesetzt (Hansen und Duerksen, 2018).

Trotz der zur Verfügung stehenden medikamentösen Therapiemöglichkeiten müssen sich bis zu 2/3 der MC-Patienten im Laufe ihrer Erkrankung einer chirurgischen Behandlung unterziehen (Gajendran et al., 2018). Stenosen, Abszesse, Fisteln, Perforationen, Darmblutungen, Konglomerattumoren und absolute therapierefraktäre Verläufe stellen Indikationen für operative, meist resezierende Eingriffe dar (Roses und Rombeau, 2008, Fischer et al., 2018).

1.4 PBMC-Modell

Bei *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) handelt es sich um Zellen mit einem runden Zellkern, welche eine wichtige Rolle innerhalb des menschlichen Immunsystems spielen. Hierzu gehören zum Beispiel Lymphozyten, Monozyten, oder Dendritische Zellen. Nicht hinzugezählt werden jedoch zellkernlose zelluläre Bestandteile des Blutes wie Erythrozyten, sowie polymorphkernige Zellen, so zum Beispiel Granulozyten. Diese Bestandteile werden von den PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Blut getrennt. Aufgrund der schnellen Isolation aus Vollblut, stellen PBMCs ein beliebtes und häufig genutztes Modell zur Abbildung des menschlichen Immunsystems dar. Hierbei eignet sich besonders die Analyse des exprimierten, bzw. sekretierten Zytokinprofils der *in vitro* stimulierten PBMCs. Dadurch kann eine mögliche Immunreaktion *in vitro* evaluiert werden (Kleiveland, 2015).

1.5 Zielstellung der Arbeit

MC ist durch eine Dysregulation des Immunsystems der Mukosa des Darmes bei genetisch prädisponierten Individuen charakterisiert. Eine wichtige Rolle hierbei spielt der NOD2-Rezeptor, welcher als „*pattern recognition receptor*“ bakterielle Bestandteile wie Muramyl-Dipeptid und Peptidoglycan, sowie dessen Fragmente erkennt.

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass MC-Patienten häufig ein Defizit an Vitamin D haben (Ananthakrishnan et al., 2012; Ratfery et al., 2015a, Schäffler et al, 2018a, White, 2018). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Vitamin D sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem wegen seiner anti-proliferativen, anti-inflammatorischen und immunmodulierenden Eigenschaften durchaus positiv beeinflussen kann (Cantorna et al., 2004; 2015; Olliver et al., 2013). Aber es gibt nur unzureichende Erkenntnisse zur Wirkung des Vitamin Ds auf das Immunsystem bei MC-Patienten.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, im Sinne eines translationalen Forschungsansatzes die Effekte von Vitamin D auf die Gen- und Proteinexpression bei PBMCs aus gesunden Probanden (HC) und Patienten mit MC zu analysieren. Die erste Zielstellung ist ein Vergleich des Zytokinprofils von PBMCs aus den gesunden Kontrollen und denen aus MC-Patienten. Dionne et al. 2014 konnten zeigen, dass PBMCs aus Morbus Crohn Patienten ein höheres TLR induziertes Expressionsniveau von pro-inflammatorischen Zytokinen, aber auch IL-10 besitzen als PBMCs aus gesunden Kontrollen. Hierzu sollte vor allem das pro-, oder anti-inflammatorische Reaktionsmuster der PBMCs aus HC und MC verglichen werden. Dafür wurden PBMC Zellen

von gesunden Kontrollen (HC) und MC-Patienten isoliert und mit verschiedenen NOD2-Liganden (PGN, MDP P3C) und LPS stimuliert. Mittels Real-Time-PCR und ELISA bzw. Legendplex-Analysen wurden die Gen- und Proteinexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und IFN- γ untersucht. Zusätzlich wurde das anti-inflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 bestimmt. Als zweites Ziel galt die Ermittlung des Einflusses von Vitamin D auf das Zytokinprofil von PBMCs aus HC und MC. Zur Ermittlung der Vitamin D Wirkung wurden die Zellen mit Vitamin D vorinkubiert und daran anschließend über definierte Zeiträume mit den Liganden co-stimuliert. Auch davon wurde die Gen- und Proteinexpression der Zytokine untersucht. Weiterhin schien es interessant die Ergebnisse im Bezug auf den *NOD2*-Mutationsstatus zu analysieren. Dafür wurde die DNA der Probanden genotypisiert und die Resultate von Wildtyp (WT, keine Mutation) und *NOD2*-Mutation (MT, hetero- und homozygote Mutationen) verglichen. Anhand solcher Daten könnten Patienten mit einer *NOD2*-Mutation möglicherweise im Sinne einer „personalisierten Medizin“ behandelt werden.

Aus den Ergebnissen dieser Experimente könnten mögliche Anhaltspunkte für weiterführende Untersuchungen, oder für eine gezielte Vitamin D Substitution bei MC-Patienten abgeleitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien und Geräte

Tabelle 2: Eingesetzte Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Produzent/Lieferant
Bluecap (5 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Brutschrank INE 200 Excellent	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
EDTA S-Monovette	Sarstedt AG, Nürnbrecht, Deutschland
Fluor-S™ Multimager	BioRad, München, Deutschland
FACS LSR Fortessa flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Gelkammer Sub-Cell, GT (Agarose)	BioRad, München, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena Deutschland
Neubauer Zählkammer	BLAUBRAND, Wertheim, Deutschland
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nalgene Cryotubes	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	BLAUBRAND, Wertheim, Deutschland
Pipette (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Power-Pac 1000	BioRad, München, Deutschland
Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Sicherheitswerkbank Class 2	Zapf, Sarstedt, Deutschland
Thermal Cycler, PTC-200	Biozym Diagnostik, Oldendorf, Deutschland
ViiA 7 sequence detection system	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer; REAX 2000	Heidolph, Heidelberg, Deutschland
Waage BP 2100	SATORIUS AG, Göttingen, Deutschland
Zellkulturflasche (250 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge GS-15 R	Beckman, Krefeld, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien und Substanzen

Chemikalien und Substanzen	Produzent/Lieferant
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DEPC (Diethyldicarbonat)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid Lösung (10 mg/ml)	Bio-Rad, München, Deutschland
Pancoll human	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Loading Dye Solution (B/X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LPS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MDP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
P3C	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
PBS-Puffer (pH 7,4)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PGN	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
rDNase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TBE-Puffer	Eigenherstellung (pro Liter: 10,8 g Tris-Base, 5,5 g Borsäure, 0,64 g EDTA; pH 8)
Tris-Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau (0,05%)	Biochrom/Merck, Berlin, Deutschland
Vitamin D3	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

2.1.3 Medien

Tabelle 4 Verwendete Medien

Medien und Zusätze	Produzent/Lieferant
RPMI-1640	Biochrom/Merck, Berlin, Deutschland
FKS	Biochrom/Merck, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Biochrom/Merck, Berlin, Deutschland

2.1.4 Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Kit	Produzent/Lieferant
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland
qPCR MasterMix	Eurogentec, Seraing, Liege, Belgien
IL-6 ELISA	EBioscience/ThermoFisher Waltham, USA
IL-10 ELISA	EBioscience/ThermoFisher Waltham, USA
LEGENDplex™ Human Inflammation Panel (13-plex)	BioLengend, Koblenz, Deutschland

2.1.5 Primer für die qPCR

Tabelle 6: Verwendete human-spezifische Taqman™-Genexpression-Assays

Gen	Assay	Produzent/Lieferant
GAPDH	Hs9999905_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IL-1 β	Hs01555410_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IL-6	Hs00174131_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IL-10	Hs00961622_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TNF- α	Hs00174128_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 7: Primer für *NOD2*-Genotypisierung

SNP	Primer Sequenz	<i>NOD2</i> -Mutation
8	forward: 5'-CCTCTTCAATTGTGGCAGGC-3' reverse: 5'-CTCCTGCATCTCGTACAGGC-3'	R702W SNP ID: rs2066844
12	forward: 5'-ATGGAGGCAGGTCCACTTTG-3' reverse: 5'-TTACCCTGAGCCACCTCAAGC-3'	G908R SNP ID: rs2066845
13	forward: 5'-GATGGTACTGAGCCTTTGTTGA-3' reverse: 5'-CAGACTTCCAGGATGGTGTGCAT-3'	L1007fs SNP ID: rs2066847

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten und gesunde Kontrollen

Für die zell- und molekularbiologischen Arbeiten mit humanem Blut liegt die Einverständniserklärung aller Studienteilnehmer vor. Die Arbeiten mit PBMCs aus Patienten- und Probandenblut wurden durch die Ethikkommission der Universität Rostock (A-2015-0042) genehmigt.

10 Patienten ($44,5 \pm 17,5$ Jahre) mit MC (5 weiblich $54 \pm 17,1$ Jahre, 5 männlich $32,2 \pm 8,9$ Jahre) wurden rekrutiert (Tabelle 9). Die Patienten wurden entsprechend der Montreal-Klassifikation eingeordnet. Die Krankheitsaktivität wurde nach dem *Crohn's disease activity index* (CDAI) bestimmt (Best et al., 1976). 10 gesunde Probanden ohne immun-vermittelte Gastrointestinal- oder Autoimmunerkrankungen wurden darüber hinaus in diese Studie eingeschlossen ($24,2 \pm 4,2$ Jahre; 3 weiblich $22 \pm 2,2$ Jahre, 7 männlich $25,1 \pm 4,5$ Jahre).

Tabelle 8: Daten der rekrutierten Morbus Crohn Patienten

Patienten Geschlecht/ Alter	Vit. D (nmol/l)	Krankheitsrele- vante Medikation	Krankheitsaktivität
männlich/ 19	42,4	Budenosid, Vedolizumab	Krankheitsaktivität im Bereich des Coecums
weiblich/ 48	67,6	Colesevelam, Vit B12	Remission
weiblich/ 78	44,7	Pantoprazol, Budenosid	Remission
weiblich/ 32	47,8	Mesalazin	Remission
weiblich/ 62	43,6	Butylscopolamin	Remission
weiblich/ 50	49,5	Infliximab, Butylscopolamin,	Remission

		Mesalazin, Budenosid	
männlich/ 38	40,2	Macrogol	Remission
männlich/ 35	56,8	Remicade, Azathioprin, Pantoprazol	Krankheitsaktivität in der Ileozökalregion, Magenbeteiligung
männlich/ 37	35	Azathioprin	Krankheitsaktivität im Bereich einer Dickdarmanastomose
männlich/ 31	51,9	-	Remission

2.2.2 Blutentnahme

Die Blutentnahmen (ca. 45 ml venöses Blut) erfolgten in der gastroenterologischen Ambulanz und auf der gastroenterologischen Station des Universitätsklinikums Rostock mittels klinischer Standardverfahren. Das Blut wurde in jeweils 7,5 ml EDTA-Blutentnahmeröhrchen dem gastroenterologischen Labor für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Unter identischen Bedingungen wurde den gesunden Probanden das Blut entnommen.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC)

Die Arbeiten mit den Zellen wurden unter einer Sicherheitswerkbank in sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Isolation der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut erfolgte mit einer Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Lösung. Grundlage dieser Methode sind die verschiedenen Dichten der Blutbestandteile. Erythrozyten und Granulozyten haben eine höhere Dichte als mononukleäre Zellen. Deshalb sammeln sich Erythrozyten und Granulozyten nach der Zentrifugation unter der Ficoll-Schicht, während sich die mononukleären Zellen in der Interphase befinden (Abb. 6).

Zu 15 ml des Blutes wurden 15 ml Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) hinzugeben. Anschließend wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen auf 15 ml Ficoll-Lösung ca. 30 ml Blut/PBS-Gemisch aufgeschichtet und diese für 20 min bei ausgeschalteter Bremse bei 900x g

zentrifugiert. Daraufhin zeigte sich eine charakteristische Phasen-Schichtung. Nach dem vorsichtigen Abtragen von 15 ml Überstand wurden die PBMCs mit Hilfe einer Pipette vorsichtig entnommen.

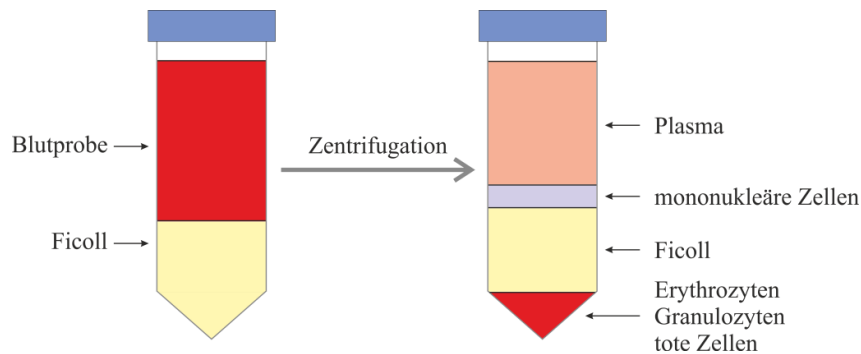


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut. Eigene Darstellung

Diese wurden in einem 15 ml Röhrchen gesammelt und anschließend für 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets mit 45 ml PBS gewaschen und erneut für 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 5 ml PBS suspendiert.

2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierzu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl PBS gemischt. 10 µl davon wurden zu 10 µl Trypanblaulösung hinzugegeben und in die mit einem Deckglas verschlossene Neubauer-Zählkammer gefüllt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden jeweils 16 Kleinquadrate unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zählung wurde 4x in verschiedenen Quadranten wiederholt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{mittlere Zellzahl pro Großquadrat} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

2.2.3.3 Einfrieren der Zellen

Zur Lagerung wurden die Zellen bei -170°C in Flüssigstickstofftanks eingefroren. Dazu wurde die Zellsuspension ein weiteres Mal bei 1200 rpm für 8 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes, wurden 15 Millionen Zellen in 500 µl fetalem Kälberserum resuspendiert und in Kryotubes mit 500 µl Einfrierlösung (FKS, 20% Dimethylsulfoxid [DMSO]) gemischt. Zum

schonenden Herunterkühlen der PBMCs wurden die Kryotubes in einen mit Isopropanol befüllten „Kühlbehälter“ gestellt und über Nacht bei -80°C gelagert. Danach wurden die Kryotubes mit den Zellen in einen Flüssigstickstofftank bei -150°C transferiert.

2.2.3.4 Zellkultur

Die tiefgefrorenen Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 45 ml Zellkulturmedium gegeben und für 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert, um die PBMCs möglichst kurze Zeit einer hohen Konzentration von Einfrierlösung auszusetzen und damit eventuellen Schädigungen vorzubeugen. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in Zellmedium resuspendiert und je 3 ml Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in die Wells der 6-Well Platten eingesät. Die Zellkultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ sowie bei 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator.

2.2.3.5 Zellstimulation

Für die Zellexperimente wurden die Zellen der einzelnen Wells mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Hierzu wurden Vitamin D3, LPS als TLR4 Ligand, MDP sowie PGN als NOD2 Liganden und ein synthetischer TLR2 Ligand Pam3Cys (P3C) verwendet.

Nach einer 4 h Inkubation (Anpassungsphase), wurden die Zellen zu gleichen Teilen in zwei unterschiedliche Versuchsansätze aufgeteilt:

Im ersten Versuchsansatz blieben die Zellen unbehandelt, während die Zellen des zweiten Versuchsansatzes mit Vitamin D3 (40 nmol/l) für 20 h vorstimuliert wurden. Nach diesen 20 h wurden die ausgewählten Liganden nach folgendem Schema (Abb. 7) zugegeben. Die Endkonzentrationen der Substanzen im Test waren:

Vitamin D3	40 nmol/l
LPS	1 µg/ml
MDP	10 µg/ml
PGN	10 µg/ml
P3C	10 µg/ml

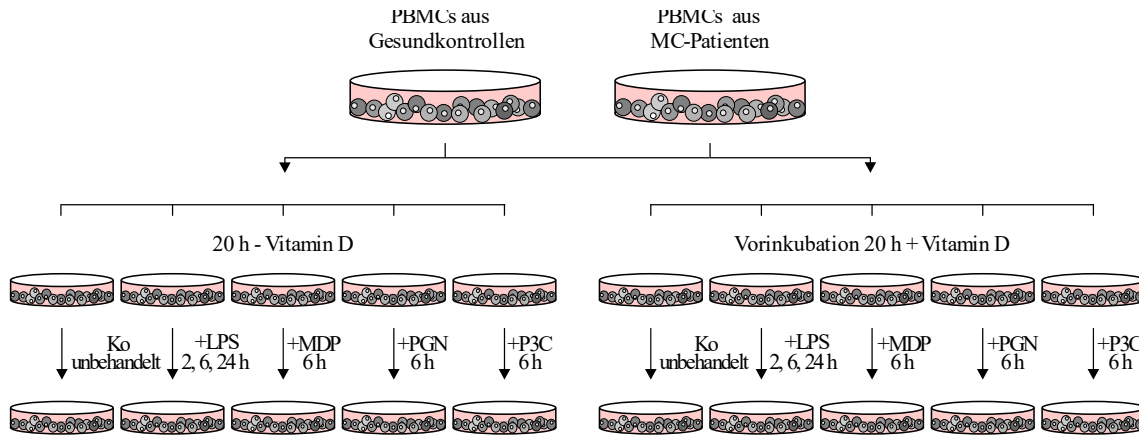


Abbildung 7: Schema der Zellstimulationen.

Nach insgesamt 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen abgeerntet. Da PBMCs nicht adhären sind, konnte die Zellsuspension eines jeden Wells in je zwei 1,5 ml Eppendorftubes überführt werden. Anschließend wurde das Kulturmedium für 8 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und der Überstand für spätere immunologische Methoden bei -20°C gelagert. Die Zellpellets wurden über Nacht bei -80°C eingefroren.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolation und DNase-Behandlung

Die Isolation der RNA aus den kultivierten PBMCs erfolgte mittels NucleoSpin® RNA-Kit. Die aufgetauten Zellpellets wurden durch Zugabe von 3,5 µl β-Mercaptoethanol und 350 µl Buffer RA1 lysiert. Die reduzierende Wirkung des β-Mercaptoethanols löst Disulfidbrückenbindungen und bewirkt so die Denaturierung von Proteinen. Das Lysat wurde in 1,5 ml Eppendorfbecher überführt und anschließend für 5 Sekunden gründlich auf einem Vortexer durchmischt. Um geeignete Bedingungen für das Binden der RNA an die Membran der NucleoSpin-Säule zu schaffen, wurden 350 µl Ethanol (70%) zum homogenisierten Lysat gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Das Gemisch wurde auf eine NucleoSpin-Säule in einem 2 ml Collection Tube gegeben und bei 11.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Zur Vorbereitung der folgenden DNase-Behandlung erfolgte die Trocknung der NucleoSpin Membran durch die Zugabe von 350 µl Membrane Desalting Buffer. In einem frischen, sterilen 2 ml Eppendorfbecher wurde der rDNase-Mix aus 10 µl rDNase-Lösung und 90 µl rDNase Reaction Buffer pro Probe vorbereitet. 95 µl dieses rDNase-Mixes wurden auf die Mitte der Membran gegeben und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin schloss sich das

mehrfache Waschen und Trocknen der Silikatmembran an. Zuerst erfolgte die Zugabe von 200 µl Buffer RAW2 auf die Säule und eine darauffolgende Zentrifugation bei 11.000 x g für 30 Sekunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues 2 ml Collection Tube gegeben. Nun wurden 600 µl Buffer RA3 auf die Membran gegeben und die Säulen für 30 Sekunden bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zurück auf das 2 ml Collection Tube gesetzt. Der gleiche Schritt wurde mit Zugabe von 250 µl Buffer RA 3 und einer Zentrifugation von 2 min bei 11.000 x g wiederholt. Zur besseren Aufreinigung der RNA-Lösung schloss sich ein Trocknungsschritt an. Hierzu wurde die NucleoSpin Säule auf ein 2 ml Collection Tube gesetzt und erneut für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in einem Nuklease-freien 1,5 ml Collection Tube platziert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 40 µl RNase freiem Wasser auf die Säulen und einer Zentrifugation für 1 min bei 11000 x g. Um eine größtmögliche Ausbeute an RNA zu erhalten, wurde das Eluat erneut auf die Membran gegeben und die Säulen danach nochmals für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Um degradierenden Schädigungen der RNA vorzubeugen, wurden die mit Eluat gefüllten Nuklease-freien Collection Tubes nach Verwerfen der Säulen sofort auf Eis gestellt.

2.3.2 Quantifizierung der RNA

Zur photometrischen Quantifizierung der RNA-Proben wurde ein NanoDrop1000 Spectrophotometer verwendet. Das Gerät wurde mit 1 µl RNase-freiem Wasser kalibriert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Absorption der RNA-Proben bei 260 nm und 280 nm. Zur Qualitätskontrolle wurde aus den Extinktionen der Quotient: 260 nm/280 nm gebildet. Bei einem Quotienten > 1,8 wurde von einer ausreichenden Reinheit der RNA ausgegangen.

2.3.3 RNA-Agarosegelelektrophorese

Um die Qualität der isolierten RNA zu prüfen, wurde eine RNA-Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Dafür wird die Eigenschaft der RNA-Fragmente als geladene Teilchen genutzt. Diese wandern entsprechend ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld. Die Porengröße der eingesetzten Agarosegele lässt sich durch variierende Agarose-Konzentration festlegen. Diese, sowie die Größe der RNA-Fragmente legen die Geschwindigkeit, mit der die Fragmente entlang des elektrischen Feldes wandern, fest. Um die RNA-Fragmente darstellen zu können, wird der

interkalierende, fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid verwendet. Dieser kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch den Vergleich mit einem Standard können nun Rückschlüsse auf die Länge der RNA-Fragmente und deren Qualität gezogen werden.

Die Herstellung des 1%-Agarosegels erfolgte unter einem Laborabzug. Hierzu wurden 1,2 g Agarose in 120 ml TBE Puffer (mit DEPC) gegeben und anschließend in einer Mikrowelle erhitzt, bis eine homogene Lösung entstand. Anschließend wurden 1,2 µl Ethidiumbromid hinzugefügt, alles gut gemischt und in einen für die Elektrophorese vorgesehenen Schlitten gegossen. Danach wurde ein Kamm zur Ausbildung der Probentaschen eingehängt und alles ca. 20 min bei Raumtemperatur bis zum Erstarren des Gels belassen. In jede Geltasche wurde ein Probengemisch aus 1 µg RNA, 3 µl B/X pipettiert und mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt. Der Schlitten mit dem Gel wurde in die Kammer eingelegt und diese mit TBE-Puffer aufgefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte für 30 min bei 120 V.

2.3.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Kit). Es wurden 0,25 µg RNA mit RNase freiem Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Parallel dazu wurde der Mastermix für die cDNA-Synthese vorbereitet. Pro Probe wurden die folgenden Reagenzien zur Herstellung des Mastermixes verwendet:

- | | |
|-------------------------|--------|
| - 10x Reaktionspuffer | 2 µl |
| - dNTPs | 0,8 µl |
| - Random Primers | 2 µl |
| - Reverse Transkriptase | 1 µl |
| - RNase freies Wasser | 4,2 µl |

In einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden zu 10 µl RNA-Lösung 10 µl Mastermix gegeben und alles durch gründliches Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Danach erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 25 °C, gefolgt von einer 2-stündigen Inkubation bei 37 °C im Thermocycler. Abgestoppt wurde die Reaktion durch eine Inkubation für 5 min bei 85 °C, ebenfalls im Thermocycler. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C, bzw. über längere Perioden bei -80 °C im Tiefkühlschrank.

2.3.5 Taqman Real-Time-PCR

Die Real-Time PCR Untersuchungen wurden zur Identifizierung möglicher mRNA Expressionsunterschiede eingesetzt. Bei der Real-Time-PCR (RT-PCR) handelt es sich um eine spezielle Form der Polymerase Kettenreaktion (PCR), welche der enzymatischen Vervielfältigung von Nukleinsäuren dient.

Die hochspezifische TaqMan-Methode basiert auf der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase. Ein Assay enthält unmarkierte, sequenzspezifische Primer und eine sequenzspezifische, mit 2 Farbstoffen markierte Sonde (TaqMan-Sonde). Die Sonde ist mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FAM oder VIC) und einem Quencher-Farbstoff (z.B. TAMRA) markiert. Solange die Sonde „intakt“ ist, wird die Fluoreszenz des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffes wegen der räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt. Bindet die Sonde an ihre Zielsequenz wird sie durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert, wodurch sich Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und Quencher räumlich voneinander entfernen. Durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm emittiert der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff ein detektierbares Fluoreszenzsignal, das mit der Anzahl der Amplifikate zunimmt. Jede PCR besteht aus sich wiederholenden Zyklen. Diese bestehen aus drei Schritten:

- 1) Denaturierung: Erhitzen der DNA auf 95 °C und damit Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden Einzelstränge der DNA verbinden.
- 2) Annealing: Herunterkühlen auf 45 °C (spezifische „Annealing Temperatur“) der Primer. Hierbei binden die Primer sequenzspezifisch an die DNA-Einzelstränge
- 3) Elongation: Die Taq-Polymerase verlängert die gebundenen Primer komplementär zum DNA-Strang und verdoppelt ihn. Dieser Schritt erfolgt bei einem Temperaturoptimum von 72 °C, da die Polymerase ihren Ursprung in *Thermophilus aquaticus* hat.

Durchführung der Real-Time-PCR:

Die cDNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser um den Faktor 1:3 verdünnt, um genügend Ausgangsmaterial für die Taqman PCRs zur Verfügung zu haben. Es wurde für jeden Morbus Crohn Patienten, bzw. gesunden Probanden die RNA-Expression für den Vitamin D Rezeptor, sowie für Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α bestimmt. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet. In jede Kavität der 96-Well Platte wurden 2,5 μ l cDNA pipettiert. Anschließend wurden pro Kavität 12,5 μ l Mastermix hinzugefügt.

Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

0,625 µl Primer

3,125 µl Wasser

6,25 µl Mastermix

Die 96-Well Platte wurde mit einer Folie verschlossen und für 1 Minute bei 1200 rpm zentrifugiert damit sich das cDNA Mastermix Gemisch am Boden der Kavitäten sammelt. Anschließend erfolgte die PCR im Thermocycler unter folgenden Bedingungen: Aufheizphase 95 °C für 10 min, 40 Zyklen mit 95 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 1 min. Die Ergebnisse wurden relativ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle berechnet. Die Berechnung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit Normalisierung zum GAPDH Gen.

$$\Delta C_t = C_{t_{\text{Zielgen}}} - C_{t_{\text{GAPDH}}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{behandelte Probe}}} - \Delta C_{t_{\text{unbehandelte Kontrolle}}}$$

$$\text{Expressionsänderung} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.3.6 *NOD2*-Genotypisierung

Diese Methode wird zur Ermittlung von individuellen Unterschieden im Genotyp der Probanden verwendet. Dafür wurde die PCR-Technik mit anschließender Sanger-Sequenzierung der entstandenen Amplikons durch die Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Die verwendete Methode ist bei Schäffler et al. (2018b, 2018d) beschrieben. Die von uns untersuchten Mutationen des *NOD2*-Gens waren: R702W (SNP 8), G908R (SNP 12), L1007fs (SNP 13). Die verwendeten Primer sind in Tab. 8 aufgezählt.

Zunächst wurde genomische DNA aus dem Probanden-Blut mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) isoliert. Dafür wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 20 µl Protease, 200 µl Blut und 200 µl Lysepuffer (AL) pipettiert, gründlich gemischt und für 10 min bei 56°C inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden 200 µl Ethanol (96-100%) zugegeben und alles gut gemischt. Der gesamte Ansatz wurde auf eine QIAamp Mini Spin Säule pipettiert und bei 8000 rpm for 1 min zentrifugiert und danach wurde die Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß gegeben. Auf die Säulen wurden mit 500 µl Puffer AW1 gegeben und wiederum bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein neues Sammelgefäß gegeben und mit 500 µl Puffer AW2 gewaschen und bei 14.000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die Säulen wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 200 µl Puffer AE und Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min eluiert. Für die anschließende PCR wurde der Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen) verwendet. Eine PCR Reaktion (25 µl) enthielt:

1 µl DNA ($\leq 1\mu\text{g}$)
1 µl Primer (forward und reverse, siehe Tabelle 8)
12,5 µl Taq PCR Master Mix
10,5 µl H₂O

Für die PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

1. 94°C, 5 min
2. 45 x 94°C, 1 min
60°C, 1 min
72°C, 1 min
3. 72°C, 7 min

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Chromas Version 2.6. (Technelysium Pty LTD). Nach Sequenzierung der PCR-Produkte wurden Probanden ohne Mutationen als Wildtyp (WT) bezeichnet.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Bead-basierte Multiplexanalyse (LEGENDplex Methode)

Bei dem LEGENDplex System handelt es sich um eine durchflusszytometrische, Bead-basierte Multiplexanalyse. Das Prinzip der Methode ähnelt dem des Sandwich-ELISAs. Die in der Probe gelösten Zytokine binden im ersten Schritt an spezifische Antikörper. Diese sind an einen entsprechenden Bead-Typ gekoppelt. Die Beads unterscheiden sich sowohl in ihrer Morphologie, als auch an ihrer Fluoreszenzintensität. Für den Nachweis der Zytokine wird ein zweiter Antikörper eingesetzt. Das ermöglicht mittels Durchflusszytometrie die gleichzeitige Bestimmung und Quantifizierung mehrerer verschiedener Zytokine in Seren und Kulturüberständen. Verwendet wurde das LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit.

Durchführung:

In jede Kavität einer 96 Well Platte wurden 25 µl Assay-Buffer gegeben. Anschließend folgte die Zugabe von 25 µl der Probenlösung, bzw. der mitgelieferten Standards. Hierauf wurden je 25 µl der Beads-Lösung in jede Kavität hinzugegeben. Schlussendlich erfolgte die Zugabe von 25 µl Detection Antikörper in alle Wells. Anschließend wurden die Platten für 2 h bei Raumtemperatur unter 600 rpm auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Daraufhin wurden in jedes

Well 25 µl Streptavidin-PE gegeben. Nachdem die Platten mit Aluminiumfolie umhüllt wurden, erfolgte eine weitere 2 h Inkubation bei 600 rpm auf dem Rüttler. Im nächsten Schritt schloss sich eine Zentrifugation bei 1000 g für 5 min an, danach wurde schließlich der Überstand vorsichtig abpipettiert. Daraufhin folgte ein Waschschrift mit 150 µl Wasch-Puffer. Nun konnte die durchflusszytometrische Quantifizierung mittels FACS erfolgen.

2.4.2. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting) handelt es sich um ein Messverfahren, dass die rasche Sortierung und Analyse von Zellen, oder Partikel erlaubt. Hierzu werden die Beads durch eine dünne Mess-Kapillare geleitet. Dabei passieren sie einen Messpunkt und werden durch einen Laser angeregt. Hierbei entsteht ein charakteristisches Streulicht und der gebundene Fluoreszenzfarbstoff wird durch den Laser angeregt. Durch die Messung der Fluoreszenz und des entstandenen Streulichtes kann nun eine Quantifizierung und Sortierung der unterschiedlichen Beads erfolgen. Die Arbeiten wurden freundlicherweise durch Mitarbeiter des Labors Gastroenterologie der UMR durchgeführt und die Daten zur Auswertung bereitgestellt.

2.4.2 ELISA

Mit dem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wird ein immunologisches Nachweisverfahren bezeichnet, das auf einer Antikörper-gekoppelten, enzymatischen Farbreaktion basiert. Bei der verwendeten Sandwich-ELISA Technik, wird eine 96-Well Mikrotiter-Platte mit einem ersten spezifischen Antikörper (*Capture-Antibody*) beschichtet. Daran binden die Antigene der zu untersuchenden Proben. Nach einer Inkubationsphase wird ein zweiter, an ein anderes Epitop des Antigens spezifisch bindender Antikörper (*Detection-Antibody*) hinzugeben. Im darauffolgenden Schritt wird ein sekundärer, mit einem Enzym-gekoppelten Antikörper zugegeben, der wiederum an den *Detection-Antibody* bindet. Eine zugegebene Substratlösung löst eine, durch das gekoppelte Enzym katalysierte, Farbreaktion aus. Die resultierende Farbintensität ist proportional der Menge an gebundenem Protein und ermöglicht anhand einer gleichzeitig erstellten Eichkurve eine quantitative Analyse von Proteinen in den Zellkulturüberständen.

Für die Ermittlung der Zytokinkonzentration in den Überständen der Zellkulturen wurden ELISA-Kits von EBioscience/Thermofisher verwendet.

Am Tag vor dem Versuch, erfolgte die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit 100 µl *Capture-Antibody*. Die Platten wurden über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Überstände aus den Wells entfernt und diese mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend mit je 200 µl ELISA-Diluent geblockt. Nach einer einstündigen Inkubationsphase (bei Raumtemperatur) wurden die Überstände wieder verworfen und die Kavitäten ein weiteres Mal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen. Parallel erfolgte das Lösen des Standards mit ELISA-Diluent, welcher anschließend nach einem vorgegebenen Schema in dazu vorgesehene Kavitäten gegeben wurde. Gleichzeitig wurden je 100 µl der zu untersuchenden Proben in die Kavitäten pipetiert. Alles wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei erneuten Waschschritten wurden je 100 µl *Detection-Antibody* in die Wells gegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden 100 µl des Avidin-HRP-Antikörpers zu jeder Probe hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur und 7-maligem Waschen, erfolgte die Zugabe von je 100 µl TMB-Lösung. Die Farbreaktion wurde nach ca. 15 min mit je 50 µl Schwefelsäure (1 mol/l) pro Well abgestoppt. Hierbei erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Farbreaktion wurde anschließend im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm quantifiziert.

2.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Prism Version 5 (Graphpad Software, San Diego, CA) verwendet. Zunächst wurde eine Normalverteilung der Ergebnisse ausgeschlossen. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mit dem non-parametrischen Mann-Whitney-U-Test oder dem Wilcoxon Test. Hierbei wurde betrachtet, inwiefern es sich im Hinblick auf die zu vergleichenden Parameter (Vitamin D Einfluss/kein Vitamin D Einfluss, Morbus Crohn Erkrankung/Gesunde Kontrollen) um abhängige, oder unabhängige Stichproben handelte. Bei dem Vergleich zwischen HC und MC wurde die Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test überprüft. Bei der Überprüfung des Einflusses einer Vitamin D Co-Stimulation erfolgte die Signifikanztestung mit Hilfe des Wilcoxon-Tests. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse angesehen, deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P) kleiner 5 % war.

3 Ergebnisse

3.1 Genexpression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in PBMCs aus gesunden Kontrollen und MC-Patienten

Zu den PBMC gehören Lymphozyten und Monozyten, die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort bei CED spielen. Deshalb wurden diese Zellen als Modellsystem für *in vitro* Untersuchungen eingesetzt.

Zur Identifizierung von Unterschieden im Genexpressionsniveau von pro- bzw. anti-inflammatorischen Zytokinen in den PBMCs wurden TaqMan Real-Time-PCR Experimente durchgeführt. Dafür wurden die Zellen nach der Isolation aus dem peripheren Blut für definierte Zeiträume mit LPS (2 h, 6 h und 24 h), P3C (6 h), MDP (6 h) und PGN (6 h) stimuliert.

Um die Wirkung von Vitamin D auf die Expression der Zytokine zu untersuchen, wurde ein Teil der PBMC für 20 h in Anwesenheit von Vitamin D (40 nmol/l) (vor)stimuliert. Anschließend wurde den Zellkulturen über definierte Zeiträume LPS, MDP, PGN bzw. P3C zugegeben (siehe Abb. 7). Danach wurde die RNA extrahiert und zur Genexpressionsanalyse in cDNA umgeschrieben.

3.1.1 Genexpression von IL-1 β bei HC und MC

Das Zytokin IL-1 β ist ein Mitglied der IL-1-Familie und wird den Entzündungsmediatoren zugeordnet. Bekannt ist, dass IL-1 β bei der Pathogenese von MC eine Rolle spielt (Reinecker et al., 1993). Deshalb wurde es in diese Untersuchungen einbezogen.

Beim Vergleich der Basalexpression der IL-1 β mRNA in PBMCs aus HC und MC-Patienten wurde festgestellt, dass die PBMCs aus MC-Patienten (Mittelwert: $1,12 \pm 0,57$) geringfügig weniger IL-1 β exprimierten als jene aus HC (Mittelwert: $1,53 \pm 0,37$).

Aus den Ergebnissen der TaqMan Real-Time-PCR (Abb. 8A) wird ersichtlich, dass bei den Zellen der Patienten mit MC die Stimulation mit den verschiedenen Liganden eine starke Erhöhung der mRNA-Expression für IL-1 β bewirkte. Eine Ausnahme bildet der Ligand MDP. Bei den gesunden Kontrollen war ein eher geringer Effekt zu verzeichnen.

LPS verursacht bei den gesunden Kontrollen nach 2 h und 6 h einen initialen Anstieg der Genexpression von IL-1 β , der sich nach 24 h wieder verringert.

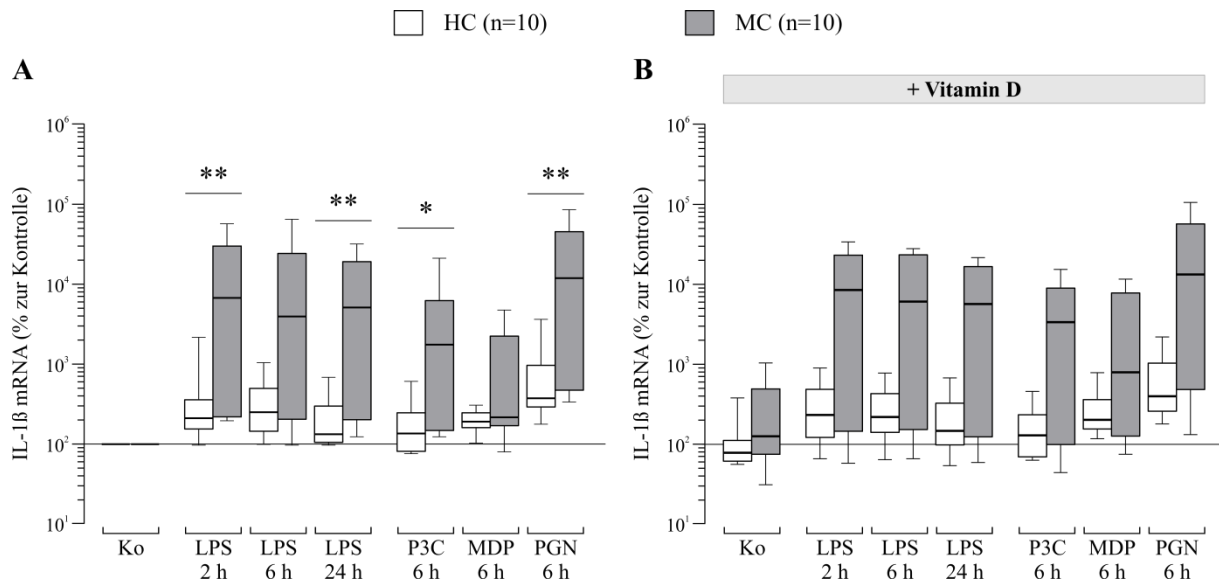


Abbildung 8: IL-1 β mRNA Expression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus HC und MC-Patienten

(A) IL-1 β mRNA Expression in PBMCs aus HC und MC. Die Zellen wurden mit LPS (2 h, 6 h, 24 h), P3C (6 h), MDP (6 h) und PGN (6 h) stimuliert. (B) Wirkung von Vitamin D auf die IL-1 β mRNA Expression in PBMCs aus HC und MC. Die Zellen wurden für 20 h mit Vitamin D (40 nmol/l) vorinkubiert und anschließend mit den Liganden über definierte Zeiträume co-inkubiert.

Es erfolgte eine logarithmische Darstellung in Boxplotform. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25. bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen die Extremwerte. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle (100% Linie). Signifikante Unterschiede zwischen HC und MC wurden mittels Mann-Whitney Test ermittelt und sind mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ gekennzeichnet. Ko = Kontrolle

Der stärkste Einfluss auf die IL-1 β Genexpression wurde durch die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von PGN für 6 h festgestellt. Dies gilt sowohl für die Zellen aus dem Blut der HC, als auch für die Zellen der MC-Patienten. Die Stimulation mit P3C für 6 h verursachte eine Erhöhung der IL-1 β -Genexpression nur in den PBMCs aus den MC-Patienten. Für MDP wurden nur geringe Veränderungen auf die IL-1 β mRNA Expression in beiden Gruppen ermittelt. Aus den Ergebnissen der Real-Time-PCR wird außerdem erkennbar, dass die Induktion der Genexpression von IL-1 β bei den Patienten deutlich höher ist als bei den Gesundkontrollen. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen wurden durch die Stimulation der Zellen mit LPS für 2 und 24 h sowie mit PGN für 6 h mit $p < 0,01$ und mit P3C für 6 h mit $p < 0,05$ errechnet.

Auch unter Behandlung mit Vitamin D für 20 h war eine stärkere mRNA-Expressionssteigerung für IL-1 β bei den PBMCs der Patienten mit MC, im Vergleich zu den HC, als Reaktion auf die Stimulation mit den Liganden, zu verzeichnen (Abb. 8B). Bei den PBMCs aus den

MC-Patienten bewirkte die Vorinkubation mit Vitamin D eine leichte Zunahme der IL-1 β -Expression bei den untersuchten Liganden LPS, MDP und P3C. Alle anderen Ergebnisse zeigen keine Unterschiede in der IL-1 β Genexpression zwischen den Zellen aus HC und MC nach Co-Stimulation mit Vitamin D. Inwiefern die Vitamin D Co-Stimulation einen Einfluss auf die Expression von IL-1 β hat, wird im Kapitel 3.2. beschrieben.

Bei den Gesundkontrollen lässt sich wieder ein Expressionsmuster für den zeitlichen Verlauf der LPS-Stimulation erkennen. Die Stärke der IL-1 β Expressionserhöhung flacht nach längerer Stimulationszeit mit LPS ab.

3.1.2 Genexpression von IL-6 bei HC und MC-Patienten

IL-6 gehört zu den Zytokinen, die mit der Regulation von Entzündungsprozessen bei MC in Zusammenhang stehen (Stevens et al., 1992; Reinecker et al., 1993).

Die Ergebnisse zur Beeinflussung der IL-6 Genexpression deuten auf ein sehr ähnliches Muster, wie es bereits bei der Genexpression von IL-1 β beobachtet wurde, hin (Abb. 9A). Die Stimulation mit den Liganden verursacht auch hier eine starke Zunahme der IL-6 mRNA-Expression, sowohl bei Erkrankten als auch bei den Gesundkontrollen. Die LPS-induzierte IL-6 Genexpression ist nach 2 h am höchsten und verringert sich nach 6 bzw. 24 h bei gesunden Kontrollen als auch bei MC-Patienten. Während die Stimulation mit MDP nur geringe IL-6 Expressionsanstiege in beiden Untersuchungsgruppen zur Folge hat, bewirkt die Stimulation mit PGN eine deutlich stärkere Erhöhung der Genexpression von IL-6. Die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von P3C ergab nur eine geringe Zunahme in den gesunden Kontrollen. Im Vergleich dazu war eine deutliche Erhöhung der IL-6 mRNA Menge bei den Zellen aus den MC-Patienten zu verzeichnen (Abb. 9A). Die Ergebnisse für IL-6 zeigen, dass die PBMCs der MC-Patienten mit einem deutlich höheren Anstieg der IL-6 mRNA-Expression auf die Stimulation mit den verwendeten Liganden reagieren als die Gesundkontrollen. Für die Stimulation mit LPS für 2 h und 24 h, sowie für die Stimulationen mit P3C und PGN konnten signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und MC-Patienten errechnet werden ($p < 0,05$).

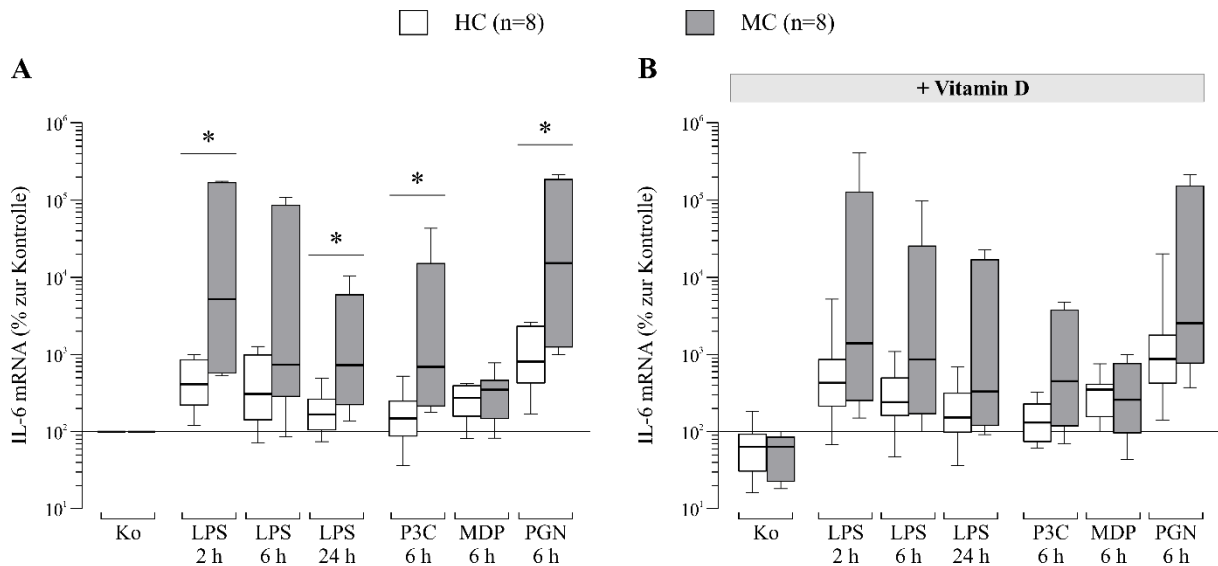


Abbildung 9: IL-6 Genexpression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus HC und MC-Patienten (A) IL-6 mRNA Expression in PBMCs aus HC und MC. Die Zellen wurden mit LPS (2 h, 6 h, 24 h), P3C (6 h), MDP (6 h) und PGN (6 h) stimuliert. (B) Wirkung von Vitamin D auf die IL-6 mRNA Expression in PBMCs aus HC und MC. Die Zellen wurden für 20 h mit Vitamin D (40 nmol/l) vorinkubiert und anschließend mit den Liganden über definierte Zeiträume co-inkubiert. Logarithmische Darstellung in Boxplotform. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25., bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen die Extremwerte. Die Ergebnisse wurden mit GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle (100% Linie). Signifikante Unterschiede zwischen HC und MC wurden mittels Mann-Whitney Test ermittelt und sind mit $*p < 0,05$ gekennzeichnet. Ko = Kontrolle

Die Behandlung mit Vitamin D und anschließende Stimulation mit den Liganden verstärkte die IL-6 Expression in beiden Untersuchungsgruppen. Bei den MC-Patienten war eine geringfügig stärkere Induktion der IL-6 Expression im Vergleich zu HC feststellbar. Eine Ausnahme bildet hierbei der Ligand MDP. Hier war kein Unterschied nachweisbar (Abb. 9B).

Beim Vergleich der Ergebnisse (Mediane) der PBMCs aus gesunden Kontrollen und MC-Patienten ohne Vitamin D Behandlung (Abb. 9B) sind die Unterschiede zwischen den Gruppen durch die Vitamin D Behandlung geringer. Im Gegensatz zu den Ergebnissen ohne Vitamin D waren hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mehr nachweisbar.

Vitamin D scheint einen modulierenden Effekt auf die Expression der IL-6 mRNA zu haben. Deutlich wird dies beim Vergleich zwischen der unbehandelten Kontrolle (100 % Linie, Abb. 9A, B) und den Zellen, die nur mit Vitamin D stimuliert wurden. Hier wurde bei Zellen aus den HC und den MC ein geringeres Expressionsniveau für die IL-6 mRNA ermittelt. Die Vitamin D-Behandlung ergab für den Liganden P3C eine starke Reduktion der IL-6 Genexpression bei den MC-Patienten (Abb. 9A, B). Um den bereits hierbei zu erkennenden Einfluss

der Vitamin D Co-Stimulation besser aufzuzeigen, wurde eine auf den Vitamin D Einfluss gewichtete Darstellungsweise erstellt. Anhand dieser wird in Abschnitt 3.2.2. die modulierende Wirkung von Vitamin D besprochen.

Das bei den anderen Untersuchungen gefundene zeitliche Expressionsmuster für die Stimulation mit LPS zeigt sich auch hier. Die Expressionserhöhung für IL-6 wird nach längerer Stimulation mit LPS in beiden Gruppen verringert.

3.1.3 Genexpression von TNF- α bei HC und MC-Patienten

TNF- α ist ein weiteres Zytokin, das an der Regulation von lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen bei MC beteiligt ist (Stevens et al., 1992; Reinecker et al., 1993). Darüber hinaus spielt eine Therapie mit einem TNF- α Inhibitor eine wichtige Rolle in der Behandlung der CED (Hanauer et al., 2002; Colombel et al., 2007; Vetter und Neurath, 2018, Fischer et al., 2018). Deshalb wurde auch für TNF- α die Beeinflussung der Genexpression als Reaktion auf die Stimulation mit den verwendeten Liganden geprüft.

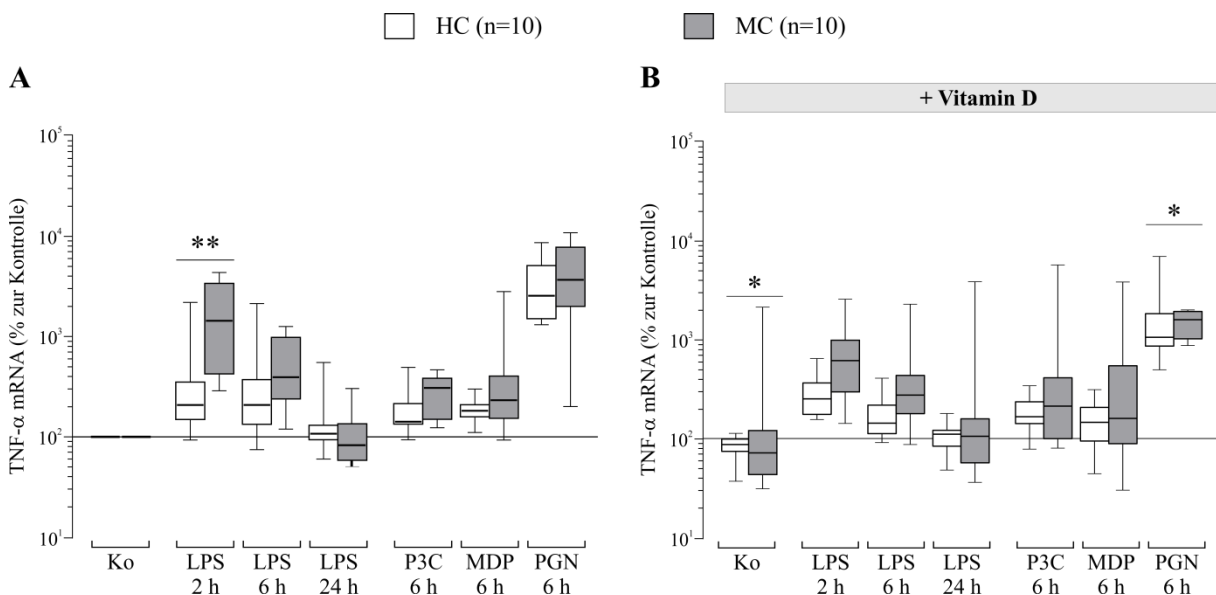


Abbildung 10: TNF- α mRNA Expression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus HC und MC-Patienten

(A) TNF- α mRNA Expression in PBMCs aus HC und MC. Die Zellen wurden mit LPS (2 h, 6 h, 24 h), P3C (6 h), MDP (6 h) und PGN (6 h) stimuliert. (B) Wirkung von Vitamin D auf die TNF- α mRNA Expression in PBMCs aus HC und MC. Die Zellen wurden für 20 h mit Vitamin D (40 nmol/l) vorinkubiert und anschließend mit den Liganden über definierte Zeiträume co-inkubiert.

Logarithmische Darstellung in Boxplotform. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25., bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen Minima, bzw. Maxima. Alle Daten wurden mit GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle (100% Linie). Signifikante Unterschiede zwischen HC und MC wurden mittels Mann-Whitney Test ermittelt und sind mit *p<0,05 und **p<0,01 gekennzeichnet. Ko = Kontrolle

Die Stimulation mit den Liganden LPS, P3C, MDP und PGN ergaben einen Anstieg der Genexpression von TNF- α in beiden Untersuchungsgruppen, im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 10A, B). Im Vergleich zu den Ergebnissen für IL-1 β und IL-6 wurde hier eine geringere Induktion der mRNA-Expression festgestellt. Das ist an den geringeren Differenzen zwischen den Medianen der Ergebnisse für HC und MC der TaqMan Versuche ersichtlich.

Auch lässt sich wie bereits bei den anderen pro-inflammatorischen Zytokinen ein ähnliches Muster im zeitlichen Verlauf der LPS-Stimulation erkennen. Diese Ergebnisse deuten auf einen initialen Anstieg der mRNA-Expression bei den gesunden Kontrollen und auch bei den MC-Patienten hin. Nach einer Stimulationsdauer von 24 h mit LPS fällt die TNF- α Genexpression bei beiden Gruppen wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrollen ab (Abb. 10A).

Die Stimulationen mit P3C und MDP bewirkten nur einen vergleichbar geringen Anstieg der Expression des Gens für TNF- α . Die Stimulation der Zellen mit PGN für 6 h verursachte die stärkste Zunahme des mRNA-Expressionsniveaus. Beim Vergleich der Genexpression zwischen HC und MC-Patienten waren keine (MDP, PGN, LPS 6 h) bzw. nicht signifikante geringe Unterschiede (P3C) feststellbar. Nur für die Stimulation mit LPS für 2 h ließ sich eine signifikant größere Menge an TNF- α mRNA bei den Erkrankten im Vergleich zu den Gesundkontrollen ermitteln ($p < 0,01$).

Die TNF- α Genexpression wird in Anwesenheit von Vitamin D in beiden Gruppen wieder durch die Wirkung der Liganden verstärkt (Abb. 10B). Eine Ausnahme bildet die Co-Stimulation mit LPS für 24 h. Hier fällt die TNF- α -mRNA Menge in beiden Gruppen wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle (100% Linie) ab. Die stärkste Induktion der TNF- α mRNA war durch PGN zu beobachten (Abb. 10B). Außerdem war erkennbar, dass nach 2 h LPS-Stimulation eine stärkere Expressionserhöhung der mRNA für TNF- α auftrat als nach 6 h, bzw. nach 24 h. Es kann festgestellt werden, dass die Behandlung und die Co-Stimulation der Zellen mit Vitamin D die TNF- α mRNA-Expressionssteigerung zu reduzieren scheint. Deutlich wird das unter anderem beim Vergleich der Mediane für die LPS-Stimulation nach 2 h bei den Zellen aus den MC-Patienten (vgl. mit Abb. 10A). Die Ergebnisse ohne Vitamin D ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (HC zu MC), der durch die Vitamin D Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Tendenziell scheint dieser Effekt des Vitamin D bei den PBMCs aus MC-Patienten stärker ausgeprägt zu sein als bei den HC. Hierfür spricht auch, dass in den Kontrollen, die nur in Anwesenheit von Vitamin D inkubiert wurden, das TNF- α Expressionsniveau in den Zellen der MC-Patienten signifikant ($p < 0,05$) geringer war als in den Zellen der HC.

Nur nach Stimulation mit PGN war die Genexpression von $\text{TNF-}\alpha$ in den Zellen der MC-Patienten in Anwesenheit von Vitamin D signifikant größer als bei den gesunden Kontrollen. Um die Wirkung der Vitamin D Co-Stimulation genauer darzustellen, wird in Abschnitt 3.2.3. eine auf den Vitamin D Einfluss gewichtete Darstellung betrachtet.

3.1.4 Genexpression von IL-10 bei HC und MC-Patienten

IL-10 ist ein anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin mit einer zentralen Bedeutung bei der Suppression von Abwehrprozessen und der Erhaltung der Mukosa-Homöostase. Der Funktionsverlust von IL-10 oder seines Rezeptors, IL-10R1, ist eng mit der Entwicklung von entzündlichen Darmerkrankungen bereits in den ersten Lebensmonaten verbunden (Shouval et al., 2014; Nunberg et al., 2018).

Für die Expression der IL-10 mRNA wurde eine Steigerung als Reaktion auf die Stimulation mit den einzelnen Liganden festgestellt. Diese ist jedoch im Vergleich mit den oben untersuchten pro-inflammatorischen Zytokinen geringer ausgeprägt (Abb.11A).

Eine Stimulation mit LPS für 2 und 6 h induziert eine Erhöhung der Expression der mRNA von IL-10 in beiden Untersuchungsgruppen, wobei das Niveau durch die Stimulationsdauer relativ stabil war. Erst nach einer Stimulation für 24 h mit LPS sinkt die mRNA-Expression in beiden Gruppen auf das Niveau in den unbehandelten Zellen ab. Den stärksten Anstieg in der Genexpression von IL-10 hat die Stimulation mit PGN für 6 h zur Folge. P3C war unter den gewählten Bedingungen ohne Effekt und MDP scheint eine Erhöhung bei den gesunden Kontrollen und eine geringe Abnahme der IL-10 mRNA bei den MC-Patienten zu verursachen. Zwar lassen sich Unterschiede in der IL-10 mRNA-Expression zwischen Gesundkontrollen und Morbus Crohn Patienten erkennen (LPS 6 h, PGN 6 h, MDP 6 h), diese waren aber nicht statistisch signifikant.

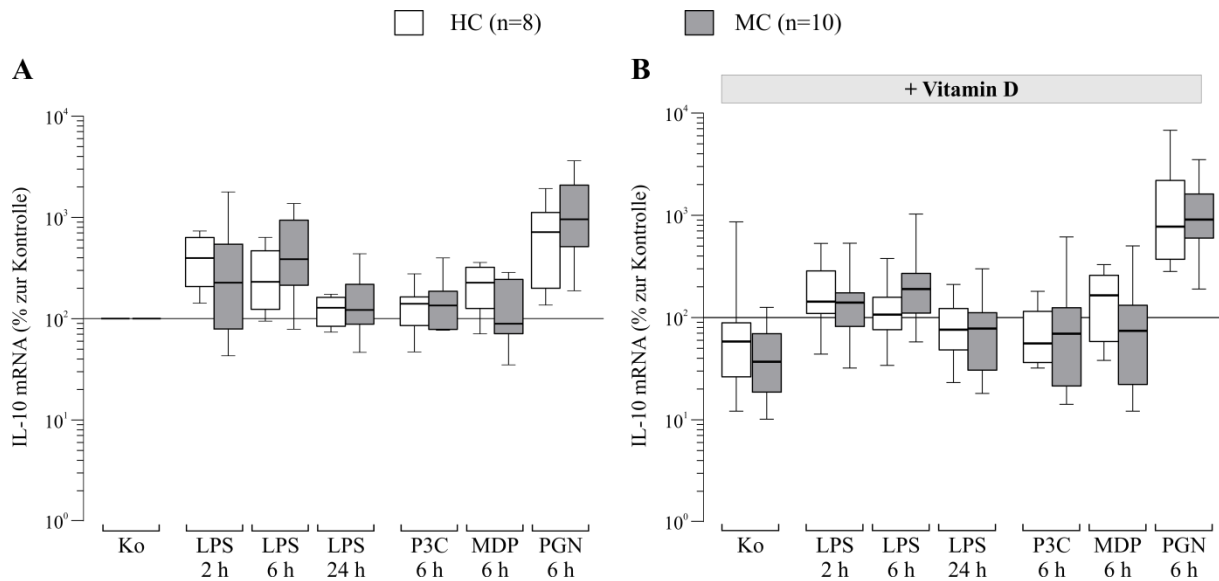


Abbildung 11: IL-10 Genexpression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus HC und MC-Patienten (A) IL-10 mRNA Expression in PBMCs aus HC und MC. Die Zellen wurden mit LPS (2 h, 6 h, 24 h), P3C (6 h), MDP (6 h) und PGN (6 h) stimuliert. (B) Wirkung von Vitamin D auf die IL-10 mRNA Expression in PBMCs aus HC und MC. Die Zellen wurden für 20 h mit Vitamin D (40 nmol/l) vorinkubiert und anschließend mit den Liganden über definierte Zeiträume co-inkubiert.

Logarithmische Darstellung in Boxplotform. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25., bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen die Extremwerte. Die Ergebnisse wurden mit GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle (100% Linie). Signifikante Unterschiede zwischen HC und MC wurden mittels Mann-Whitney Test geprüft. Ko = Kontrolle

Unter Co-Stimulationsbedingungen mit Vitamin D und den einzelnen Liganden zeigte sich, dass die PBMCs der MC-Patienten, im Verhältnis zu den HC keine erhöhte IL-10 Expression nach Stimulation mit den einzelnen Liganden aufweisen (Abb. 11B). Eine Ausnahme bildet die Co-Stimulation mit PGN, bei der dennoch eine Expressionssteigerung für IL-10 zu verzeichnen war. Durch den Vergleich mit den Ergebnissen ohne Vitamin Behandlung aus Abbildung 11A ist dieser hemmende Effekt des Vitamin Ds besonders in Anwesenheit von LPS für 2 und 6 h zu erkennen. Beim Liganden P3C fällt die IL-10 mRNA Menge sogar unter das Niveau der unbehandelten Kontrolle (100% Linie) ab. Beeinflusst wird die IL-10 Expression durch Vitamin D in beiden Gruppen gleichermaßen.

Allgemein scheint Vitamin D die, durch die Liganden induzierte, Expression der IL-10 mRNA zu verringern. Eine Ausnahme bildet dabei der Ligand PGN. Im folgenden Kapitel wird nun die Wirkung der Vitamin D Co-Stimulation im Detail betrachtet.

3.2 Vergleich der Wirkung von Vitamin D auf die PBMCs aus HC und MC-Patienten

Die Ergebnisse zum Einfluss von Vitamin D werden in den folgenden Abschnitten zum direkten Vergleich auf die Genexpression diverser pro- und anti-inflammatorischer Zytokine zwischen gesunden Kontrollen und MC-Patienten eingesetzt.

3.2.1 Wirkung von Vitamin D auf die Genexpression von IL-1 β bei HC und MC-Patienten

Zur Untersuchung des Einflusses von Vitamin D auf die Genexpression von IL-1 β wurden die unbehandelten Proben mit den Proben, welche eine Vorstimulation mit Vitamin D erhielten, verglichen (Abb.12).

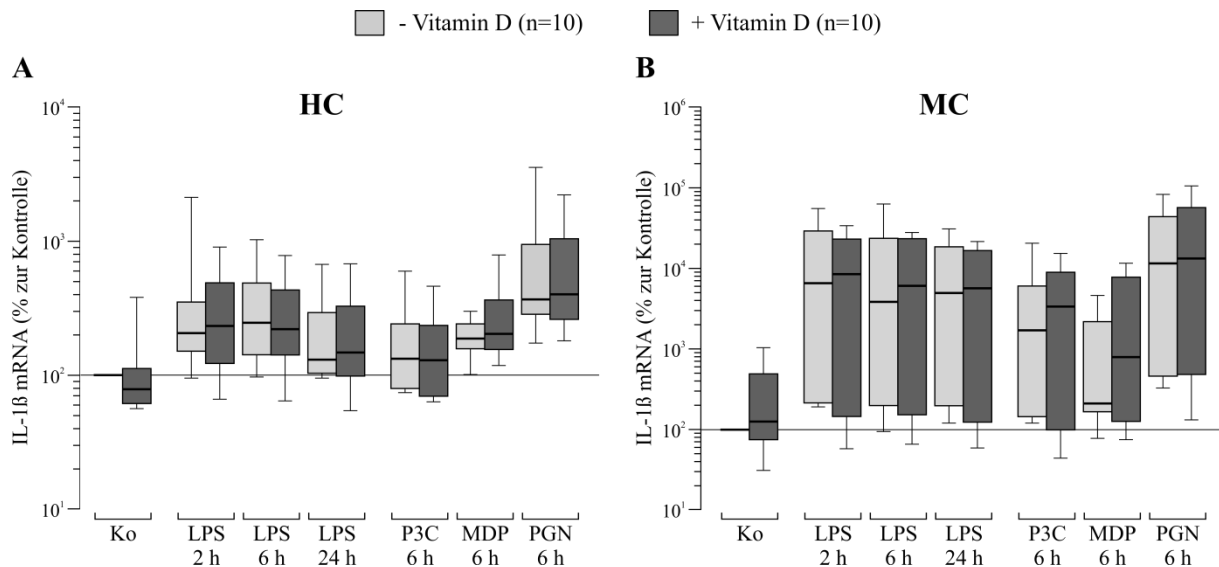


Abbildung 12: Vergleich der Genexpressionsänderung von IL-1 β in PBMCs aus HC und MC-Patienten mit und ohne Vitamin D.

(A) Ergebnisse der Untersuchungen mit den PBMCs aus HC. (B) Ergebnisse der Untersuchungen mit den PBMCs aus MC-Patienten. Nach 20 h Stimulation mit Vitamin D (40 nmol/l) wurden die Zellen über definierte Zeiträume mit LPS (2 h, 6 h, 24 h), mit P3C (6 h), mit MDP (6 h) oder mit PGN (6 h) co-stimuliert. Logarithmische Darstellung in Boxplotform. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25., bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen Minima, bzw. Maxima. Die Ergebnisse wurden mit GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle (100% Linie). Signifikante Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne Vitamin D-Behandlung wurden mittels Wilcoxon Test geprüft. Ko = Kontrolle

Aus den Ergebnissen lässt sich erkennen, dass eine Vorstimulation mit Vitamin D von 20 h tendenziell keinen Einfluss auf die Genexpression von IL-1 β bei den Gesundkontrollen hat (Abb. 12A). Nur in den Kontrollen lässt sich ein leicht verringertes Expressionsniveau von IL-

1 β bei den Vitamin D vorstimulierten Zellen im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen erkennen. Auch hier wurde eine Verringerung der IL-1 β Genexpression nach LPS Stimulation für 24 h im Vergleich zu 2 und 6 h in beiden Gruppen festgestellt.

Abbildung 12B stellt die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von Vitamin D auf die IL-1 β Genexpression bei PBMCs aus MC-Patienten dar. Durch die Stimulation mit den verschiedenen Liganden wurde die IL-1 β Expression in den meisten Fällen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stark induziert. Ausnahmen dabei bilden die Stimulation mit MDP und die Zellen, die nur mit Vitamin D behandelt wurden. Hier war ein geringerer Effekt feststellbar. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnten tendenziell keine Änderungen in der IL-1 β mRNA-Expression durch die Vitamin D-Behandlung der Zellen ermittelt werden. Eine Ausnahme bildet die MDP Stimulation. Der Vergleich der Mediane deutet sogar auf eine Zunahme an IL-1 β mRNA durch die Vitamin D-Behandlung hin.

3.2.2 Wirkung von Vitamin D auf die Genexpression von IL-6 bei HC und MC-Patienten

Für die IL-6-Genexpression wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen ohne Vitamin D im Vergleich zu den Zellen mit Vitamin D Co-Stimulation bei den gesunden Kontrollen festgestellt (Abb. 13A). Ähnlich der Ergebnisse für IL-1 β zeigt sich auch hier die Tendenz, dass Vitamin D für 20 h in den Kontrollproben eine leichte, aber nicht signifikante Verringerung der IL-6-Genexpression bewirkt.

Weiterhin wurde auch für die IL-6-Genexpression nach einer frühen Induktion durch LPS (2 h) eine Verringerung des LPS-Effektes nach 6 und 24 h festgestellt. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen Zellen, die mit Vitamin D bzw. ohne Vitamin D kultiviert wurden, ermittelt werden.

Die IL-6 Genexpression wurde durch die eingesetzten Liganden erhöht. Besonders stark war der Effekt auf die IL-6 mRNA in Anwesenheit von LPS (2 h) bzw. PGN (6 h) (Abb. 13B).

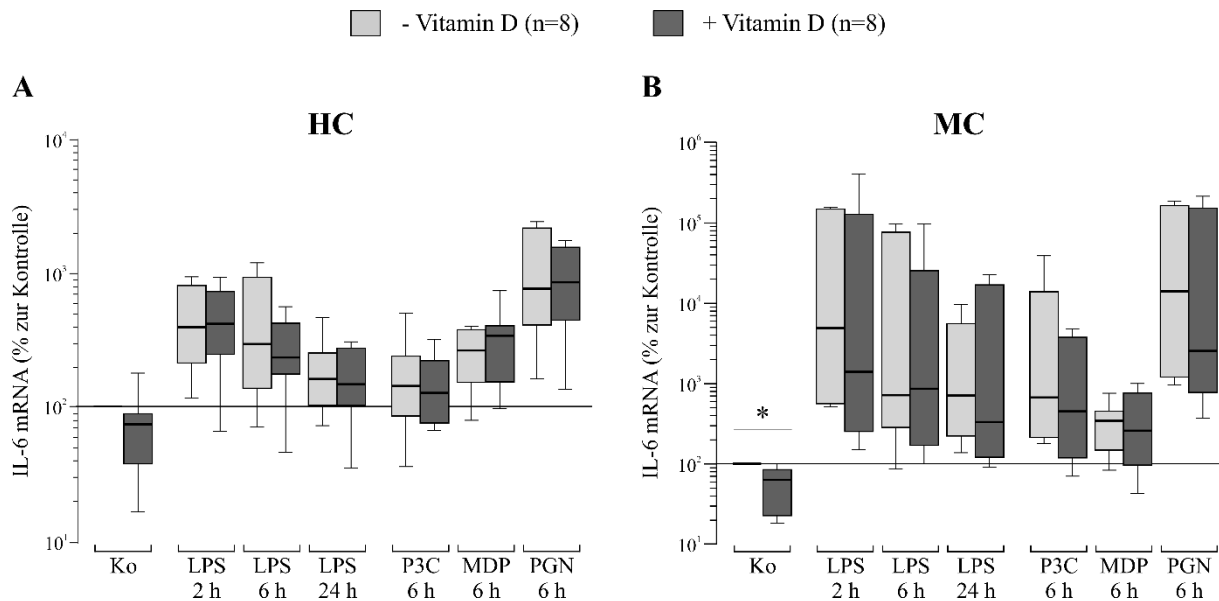


Abbildung 13: Vergleich der Genexpressionsänderung von IL-6 in PBMCs aus HC und MC-Patienten mit und ohne Vitamin D.

(A) Ergebnisse der Untersuchungen mit den PBMCs aus HC. (B) Ergebnisse der Untersuchungen mit den PBMCs aus MC-Patienten. Nach 20 h Stimulation mit Vitamin D (40 nmol/l) wurden die Zellen über definierte Zeiträume mit LPS (2 h, 6 h, 24 h), mit P3C (6 h), mit MDP (6 h) oder mit PGN (6 h) co-stimuliert. Die Ergebnisse sind als logarithmische Darstellung in Boxplotform gezeigt. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25., bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen Minima, bzw. Maxima. Die Ergebnisse wurden mit GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle (100% Linie). Signifikante Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne Vitamin D-Behandlung wurden mittels Wilcoxon Test geprüft und sind mit $*p < 0,05$ gekennzeichnet. Ko = Kontrolle

Bei den PBMCs aus den MC-Patienten wurde unter Kontrollbedingungen (ohne Ligandenzugabe) durch die Behandlung mit Vitamin D eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der IL-6 mRNA festgestellt (Abb. 13B). In einigen Fällen der Co-Inkubation mit den Liganden war dieser tendenziell reduzierende Effekt ebenfalls feststellbar. Das betrifft speziell die Co-Inkubation mit LPS für 2 h und mit PGN nach 6 h. Diese IL-6 Expressionsunterschiede waren jedoch nicht signifikant.

3.2.3 Wirkung von Vitamin D auf die Genexpression von TNF- α bei HC- und MC-Patienten

Unter den angewandten Bedingungen wurden auch für die Genexpression von TNF- α bei den PBMCs der Gesundkontrollen nur geringe Unterschiede durch den Einfluss der Vitamin D Co-Stimulation festgestellt (Abb. 14A). Die Ergebnisse deuten aber wieder, wie bei den anderen untersuchten pro-inflammatorischen Zytokinen, einen nicht signifikanten Trend zur Verringerung der Expression durch den Vitamin D-Einfluss in den Kontrollen an.

PGN hatte bei diesen Untersuchungen den stärksten induzierenden Effekt auf die TNF- α mRNA-Expression. Durch die Vitamin-D Co-Stimulation konnte eine deutliche, aber nicht signifikante Verringerung der PGN-induzierten TNF- α mRNA-Expression festgestellt werden.

Für alle anderen Stimulationen, mit Ausnahme von LPS 24 h, wurden zwar leichte, nicht signifikante Expressionszunahmen für TNF- α ermittelt, jedoch konnten keine Unterschiede mit und ohne Vitamin D festgestellt werden.

Auch aus den Ergebnissen der LPS Stimulation für 6 h wird diese Tendenz ersichtlich. Es konnten jedoch statistisch keine Signifikanzen für diese Expressionsunterschiede gezeigt werden.

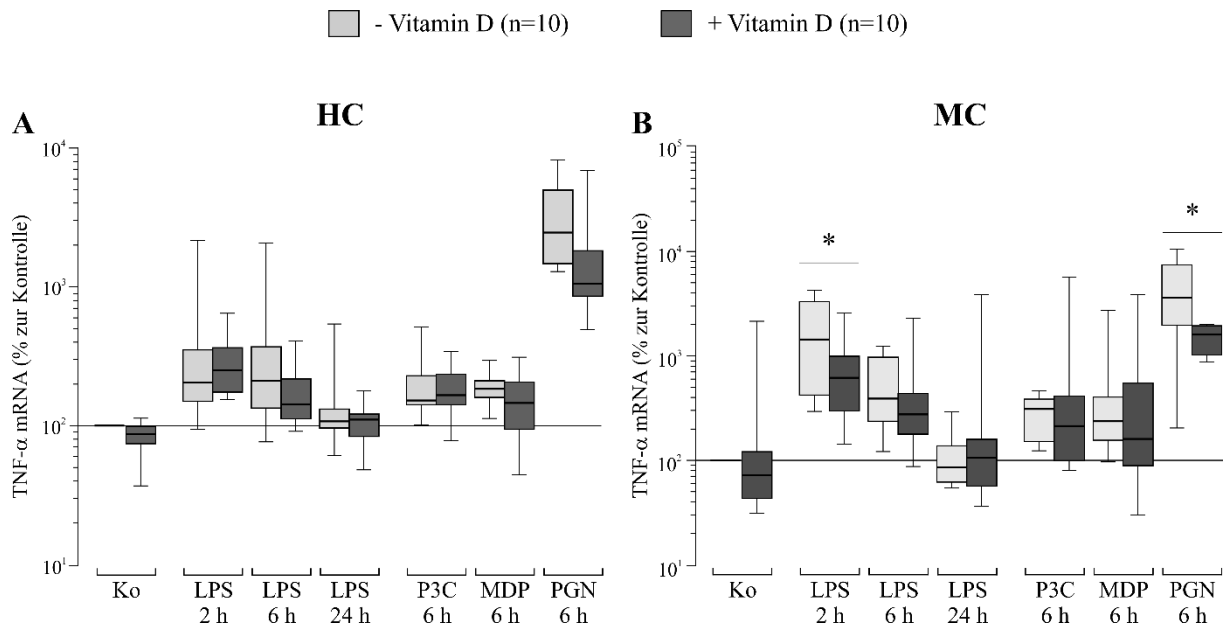


Abbildung 14: Vergleich der Genexpressionsänderung von TNF- α in PBMCs aus HC und MC-Patienten mit und ohne Vitamin D.

(A) Ergebnisse der Untersuchungen mit den PBMCs aus HC. (B) Ergebnisse der Untersuchungen mit den PBMCs aus MC-Patienten. Nach 20 h Stimulation mit Vitamin D (40 nmol/l) wurden die Zellen anschließend mit LPS (2 h, 6 h und 24 h), mit P3C (6 h), mit MDP (6 h) und mit PGN (6 h) stimuliert. Die Ergebnisse sind als logarithmische Darstellung in Boxplotform gezeigt. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25., bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen Minima, bzw. Maxima. Die Ergebnisse wurden mit GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle (100% Linie). Signifikante Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne Vitamin D-Behandlung wurden mittels Wilcoxon Test geprüft und sind mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet. Ko = Kontrolle

Im unstimulierten Zustand zeigte Vitamin D einen hemmenden Effekt auf die TNF- α mRNA der PBMCs aus den MC-Patienten. Dieser Effekt blieb jedoch nicht signifikant (Abb. 14B).

Mit Ausnahme von LPS für 24 h induzierten die eingesetzten Liganden die TNF- α Genexpression in unterschiedlichem Maße. Die Ergebnisse dieser Experimente weisen wieder auf

eine Reduktion der LPS-Wirkung über die Inkubationszeit in beiden Untersuchungsgruppen hin.

Die Vitamin D Behandlung scheint einen reduzierenden Effekt auf die Liganden-induzierte TNF- α mRNA-Expression zu bewirken. Für die Stimulation der PBMCs mit LPS für 2 h und mit PGN für 6 h war der Effekt des Vitamin D im Vergleich zu den Zellen ohne Vitamin D-Behandlungen signifikant ($p < 0,05$).

3.2.4 Wirkung von Vitamin D auf die Genexpression von IL-10 bei HC und MC-Patienten

Nach Behandlung der PBMCs von Gesundkontrollen mit Vitamin D konnten Verringerungen der IL-10 mRNA-Expression festgestellt werden (Abb. 15).

Bereits unter Kontrollbedingungen wurde durch die Vitamin D-Behandlung bei den HC eine signifikant ($p < 0,05$) geringere IL-10-Genexpression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ermittelt. Die LPS-induzierte IL-10 mRNA Expression nach 2 und 6 h wurde durch die Wirkung von Vitamin D signifikant ($p < 0,01$) reduziert. Dieser Trend war für die anderen Liganden ebenfalls zu beobachten, auch wenn hier keine statistischen Signifikanzen nachgewiesen werden konnten. Eine Ausnahme bildet hier die Stimulation mit PGN. Die starke Induktion der IL-10 mRNA Expression blieb durch Vitamin D unbeeinflusst (Abb. 15A).

Die Behandlung der PBMCs aus den MC-Patienten mit LPS (2 und 6 h) bzw. PGN (6 h) verstärkte die IL-10 mRNA Expression, während mit LPS (24 h), P3C (6 h) bzw. MDP (6 h) keine oder nur geringe Effekte festgestellt wurden (Abb. 15B).

Die Behandlung der Zellen für 20 h mit Vitamin D verringerte tendenziell die Expression der IL-10 mRNA. Eine Ausnahme bilden hierbei die Zellen, die in Anwesenheit von PGN bzw. MDP co-kultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen verändert die Vitamin D-Behandlung die Liganden-induzierte IL-10 Expression nicht.

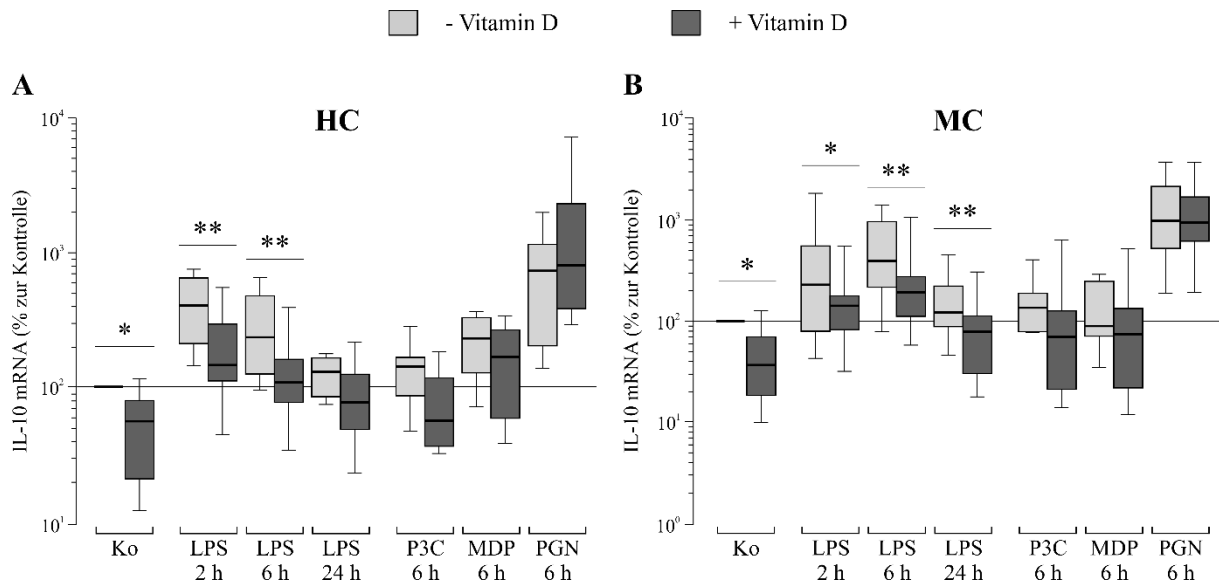


Abbildung 15: Vergleich der Genexpressionsänderung von IL-10 in PBMCs aus HC und MC-Patienten mit und ohne Vitamin D.

(A) Ergebnisse der Untersuchungen mit den PBMCs aus HC (n=8). (B) Ergebnisse der Untersuchungen mit den PBMCs aus MC-Patienten (n=10). Die PBMCs wurden für 20 h mit Vitamin D (40 nmol/l) (vor)stimuliert und anschließend mit LPS (2 h, 6 h und 24 h), mit P3C (6 h), mit MDP (6 h) und mit PGN (6 h) co-stimuliert. Logarithmische Darstellung in Boxplotform. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25., bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen Minima, bzw. Maxima. Die Ergebnisse wurden mit GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle (100% Linie). Signifikante Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne Vitamin D-Behandlung wurden mittels Wilcoxon Test geprüft und sind mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ gekennzeichnet. Ko = Kontrolle

Die unbehandelten Kontrollen (ohne Liganden) zeigen eine signifikant ($p < 0,05$) höhere IL-10 Expression, als die Zellen, die nur mit Vitamin D stimuliert wurden.

Die LPS-induzierte IL-10 Genexpression wurde durch die Wirkung von Vitamin D über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant reduziert (LPS 2 h, $p < 0,05$; LPS 6 h und 24 h, $p < 0,01$).

Auch für die Stimulation mit P3C lässt sich eine leichte, nicht signifikante Verringerung der IL-10 Expression durch Vitamin D erkennen.

3.3 Einfluss von homo- bzw. heterozygoten *NOD2*-Mutationen

Um den Einfluss einer *NOD2*-Mutation auf das pro- und anti-inflammatorische Zytokinprofil in den untersuchten Probanden zu prüfen, wurden die Resultate der TaqMan-Analysen für IL-1 β , IL-6 und IL-10 bezüglich des *NOD2*-Mutationsstatus erneut subgruppiert. Gesunde Kontrollen und MC-Patienten in Remission mit *NOD2*-Wildtyp (WT) wurden als WT bezeichnet. Probanden mit homo- bzw. heterozygotem *NOD2*-Mutationsstatus (MT) wurden der zweiten Gruppe zugeordnet. Zur Ermittlung des *NOD2*-Mutationsstatus wurden Genotypisierungen durchgeführt (siehe 2.3.6).

3.3.1 IL-1 β mRNA Expression

Um die Ergebnisse der IL-1 β -Expression in den Kontext des *NOD2*-Mutationsstatus zu setzen, wurden die Daten der WT-Gruppe mit denen der MT-Gruppe verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

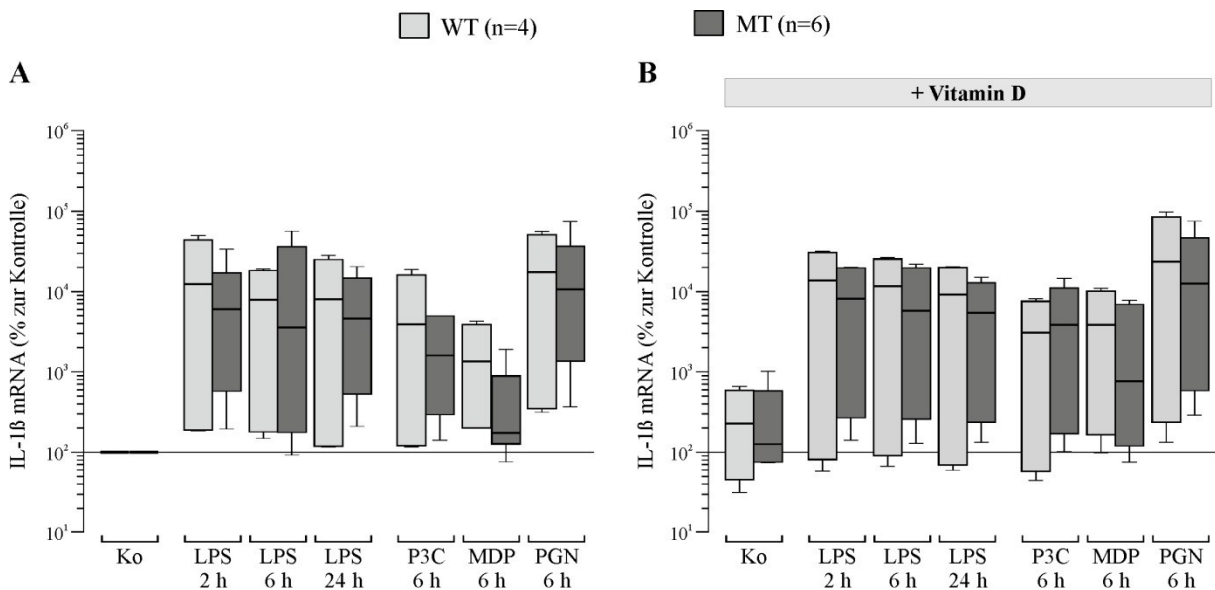


Abbildung 16: IL-1 β mRNA Expression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus Probanden mit *NOD2*-Wildtyp (WT) und Probanden mit homo- und heterozygotem *NOD2*-Mutationsstatus (MT)

(A) IL-1 β mRNA Expression in PBMCs aus WT und MT. Die Zellen wurden mit LPS (2 h, 6 h, 24 h), P3C (6 h), MDP (6 h) und PGN (6 h) stimuliert. (B) Wirkung von Vitamin D auf die IL-1 β mRNA Expression in PBMCs aus WT und MT. Die Zellen wurden für 20 h mit Vitamin D (40 nmol/l) vorinkubiert und anschließend mit den Liganden über definierte Zeiträume co-inkubiert.

Es erfolgte eine logarithmische Darstellung in Boxplotform. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25., bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen die Extremwerte. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle (100% Linie). Ko = Kontrolle

Der Vergleich der IL-1 β Genexpression ergab nur geringe Unterschiede zwischen WT und MT. Ein leichter, nicht signifikanter Unterschied wurde für die Stimulation mit MDP beobachtet. Hier exprimierten die Zellen aus den MT weniger IL-1 β als die PBMCs der WT. Dieser Unterschied war auch nach der Co-Inkubation mit Vitamin D nachweisbar. Für alle weiteren Behandlungen der PBMC Zellkulturen mit und ohne Vitamin D ergaben sich keine Unterschiede im IL-1 β Expressionsmustern zwischen WT und MT.

3.3.2 IL-6 mRNA Expression

Ein Vergleich der Expressionsmuster des pro-inflammatorischen IL-6 zwischen WT und MT sollte die bereits gesammelten Erkenntnisse aus den Untersuchungen zu IL-1 β vervollständigen (Abb. 17).

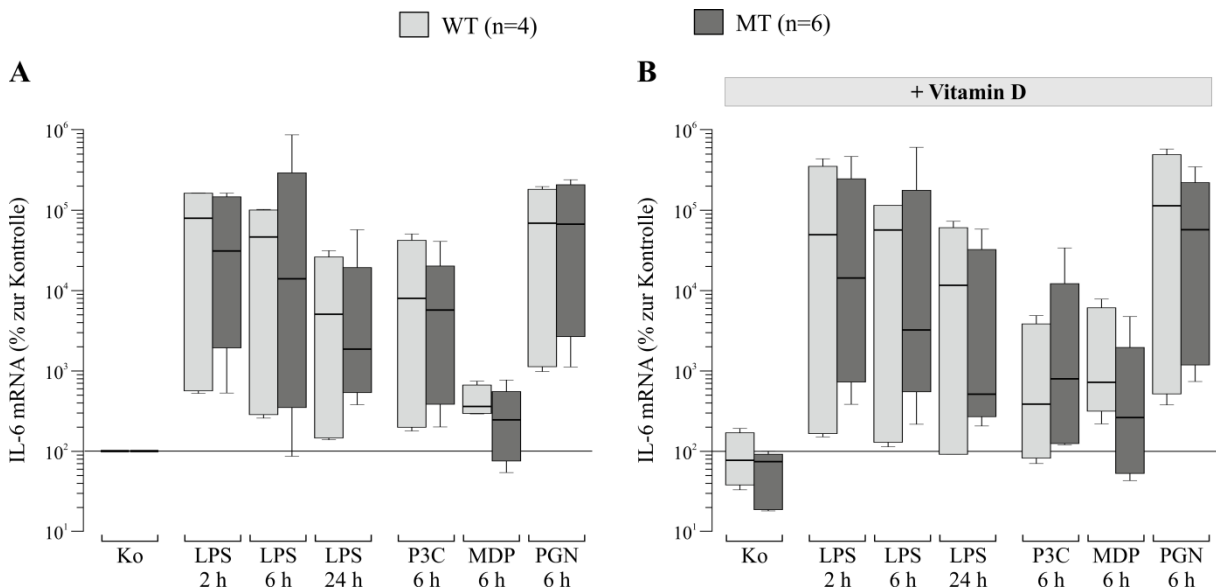


Abbildung 17: IL-6 mRNA Expression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus WT und MT

(A) IL-6 mRNA Expression in PBMCs aus WT und MT. Die Zellen wurden über definierte Zeiträume mit LPS, P3C, MDP und PGN stimuliert. (B) Wirkung von Vitamin D auf die IL-6 mRNA Expression in PBMCs aus WT und MT. Dafür wurden die PBMCs mit Vitamin D (40 nmol/l) vorinkubiert und anschließend mit den Liganden über definierte Zeiträume co-inkubiert. Die Ergebnisse sind als Boxplots dargestellt. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25., bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen die Extremwerte. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle. Ko = Kontrolle

Auch für die IL-6 mRNA Expression bei den PBMCs wurden kaum Unterschiede zwischen WT und MT ersichtlich. Mit Ausnahme von PGN (ohne Vitamin D, Abb. 17A) und P3C (mit Vitamin D, Abb. 17B) scheinen die IL-6 Expressionsniveaus insgesamt mit und ohne Vitamin D Vorinkubation in MT leicht geringer zu sein als in WT. Dies zeigt sich vor allem für die

Stimulation mit LPS für 24 h und für die Stimulation mit MDP. Beim Vergleich der Mediane der LPS Stimulationen ist die IL-6 Expression durch die Vitamin D Vorinkubation der MT geringer (nicht signifikant) als ohne Vitamin D.

3.3.3 IL-10 mRNA Expression

Weiterhin wurde in diesen Gruppen der Einfluss von *NOD2*-Mutationen auf die Expression des anti-inflammatorischen IL-10 verglichen (Abb. 18).

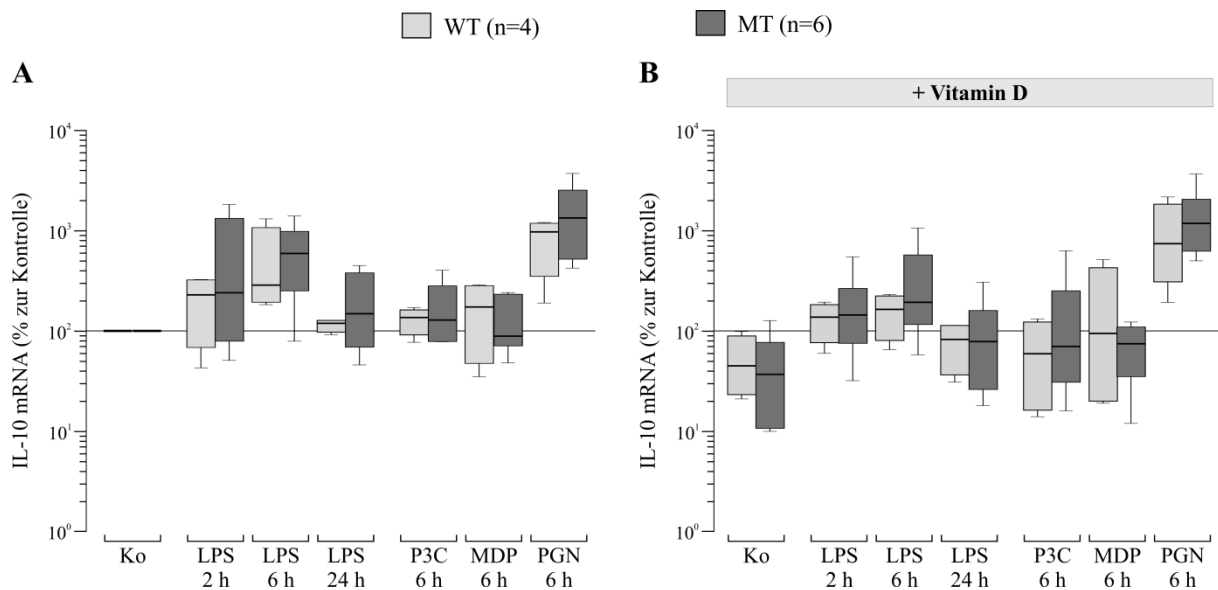


Abbildung 18: IL-10 mRNA Expression Expression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus WT und MT

(A) IL-10 mRNA im PBMCs aus WT und MT. Die Zellen wurden über definierte Zeiträume mit LPS, P3C, MDP und PGN stimuliert. (B) Wirkung von Vitamin D auf die IL-10 mRNA Expression in PBMCs aus WT und MT. Dafür wurden die PBMCs mit Vitamin D (40 nmol/l) vorinkubiert und danach mit den Liganden über definierte Zeiträume co-inkubiert. Die Ergebnisse sind in Boxplotform dargestellt. Die mittleren, vertikalen Linien stellen den Median dar, die äußeren Kanten jeweils die 25., bzw. die 75. Perzentile. Die beiden Whisker zeigen die Extremwerte. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert. Gezeigt sind relative Expressionsunterschiede zur unbehandelten Kontrolle. Ko = Kontrolle

Hierbei konnten keine Unterschiede in der IL-10 Expression zwischen WT und MT unter den getesteten Bedingungen gezeigt werden. Auch die Co-Stimulation mit Vitamin D hat hierauf nach der angewandten Methodik keinen Einfluss.

3.4 Proteinexpression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in PBMC von HC Kontrollen und MC-Patienten

Aus den Ergebnissen der TaqMan-PCR Experimente konnten hemmende Effekte der Vitamin D-Behandlung auf die Genexpression für IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-10 bei den PBMCs aus Morbus Crohn Patienten und auch aus den gesunden Kontrollen ermittelt werden. Nun sollte im Weiteren analysiert werden, ob sich diese Effekte auf die mRNA auch auf Proteinebene nachweisen lassen. Dafür wurde die Sekretion der Proteine in der Zellkultur geprüft. Für diese Untersuchungen wurden die Überstände aus den Zellkulturen, die für die RNA Isolation verwendet wurden, eingesetzt. Die Überstände wurden für die Ermittlung der Zytokinkonzentration sowohl mittels Sandwich-ELISA als auch mit der Legendplex-Methode verwendet. In Vorversuchen zeigte sich, dass das Muster der Proteinsekretion von IL-1 β und IL-6 der mRNA-Expression sehr ähnlich waren. Aus diesem Grund wurden als zu überprüfende Proteine die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IFN- γ , sowie das anti-inflammatorische IL-10 ausgewählt. Aus den Experimenten zur mRNA Expression zeigte sich, dass die Expressionsunterschiede und der Vitamin D Einfluss bei den PBMCs der beiden Gruppen für die Liganden LPS und PGN für 6 h am stärksten ausgeprägt war. Deshalb wurden auch speziell die Überstände aus diesen Stimulationsbedingungen zur Untersuchung der Proteinsekretion eingesetzt.

3.4.1 Einfluss von Vitamin D auf die IL-6 Proteinsekretion bei HC und MC-Patienten

Für diese Versuche wurden Sandwich-ELISAs für das Zytokin IL-6 der Firma E-Bioscience/ThermoFisher verwendet. Es wurden Überstände aus den PBMC-Kulturen von HC und MC-Patienten mit und ohne Vitamin D Behandlung eingesetzt.

Festgestellt werden kann, dass die PBMCs von MC-Patienten deutlich weniger IL-6 sezernieren als die PBMCs von HC (Abb. 19). Auch durch die Stimulation mit LPS oder PGN für jeweils 6 h, verändert sich die Menge an IL-6 in den Überständen der Zellen der gesunden Kontrollen nicht.

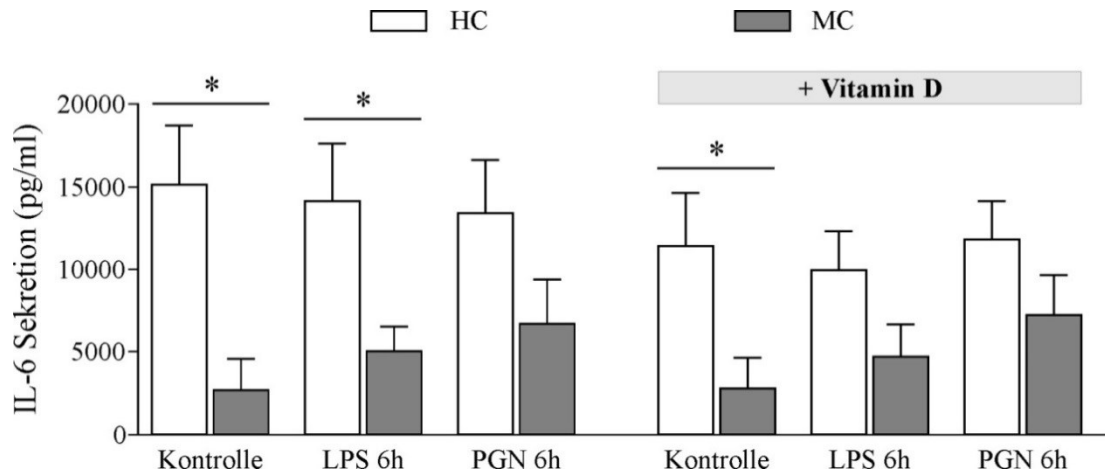


Abbildung 19: Effekt von Vitamin D auf die Sekretion von IL-6 bei PBMCs aus HC und MC-Patienten. Die PBMCs aus gesunden Kontrollen (HC, n=6) und Morbus Crohn Patienten (MC, n=6) wurden mit und ohne Vitamin D für 20 h behandelt und daran anschließend wurden LPS (6 h) oder PGN (6 h) zugegeben und alles über die angegebenen Zeiten co-inkubiert. Die Ergebnisse sind als Säulendiagramme \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne Vitamin D Behandlung wurden mittels Wilcoxon Test geprüft und sind mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet. Ko = Kontrolle

Demgegenüber wurde bei den Zellen aus den MC-Patienten durch die Stimulation mit LPS oder PGN eine Erhöhung der IL-6-Sekretion nachgewiesen. Dabei induzierte der Ligand PGN die IL-6 Sekretion am stärksten.

Die Behandlung der PBMCs mit Vitamin D verursachte bei den Zellen aus den gesunden Kontrollen eine leichte Verringerung der IL-6 Sekretion, obwohl auch hier kein Unterschied in der Menge an sezerniertem Protein zwischen der Kontrolle und der Stimulation mit den Liganden zu erkennen ist.

Bei den Zellen aus den MC-Patienten scheint Vitamin D keinen Einfluss auf die IL-6 Sekretion zu haben. Insgesamt lässt sich statistisch weder für die Proteinsekretion aus Zellen von MC-Patienten noch für die der Zellen der Gesundkontrollen ein signifikanter Einfluss von Vitamin D zeigen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den erhobenen Daten zur IL-6 mRNA Expression. Signifikante Unterschiede in der IL-6 Sekretion wurden zwischen den Zellen aus den gesunden Kontrollen und den aus MC-Patienten (Kontrollen mit und ohne Vitamin D sowie LPS 6 h ohne Vitamin D) festgestellt.

3.4.2 IL-10 Proteinsekretion und Wirkung von Vitamin D bei HC und MC-Patienten

Mit IL-10 wurde auch ein anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin in die Untersuchungen einbezogen. Um den immunregulatorischen Einfluss von Vitamin D zu analysieren, wurde für das

anti-inflammatorische Zytokin IL-10 die Konzentration in den Überständen der Zellkulturen mittels ELISA als auch mit der LEGENDplex-Methode untersucht.

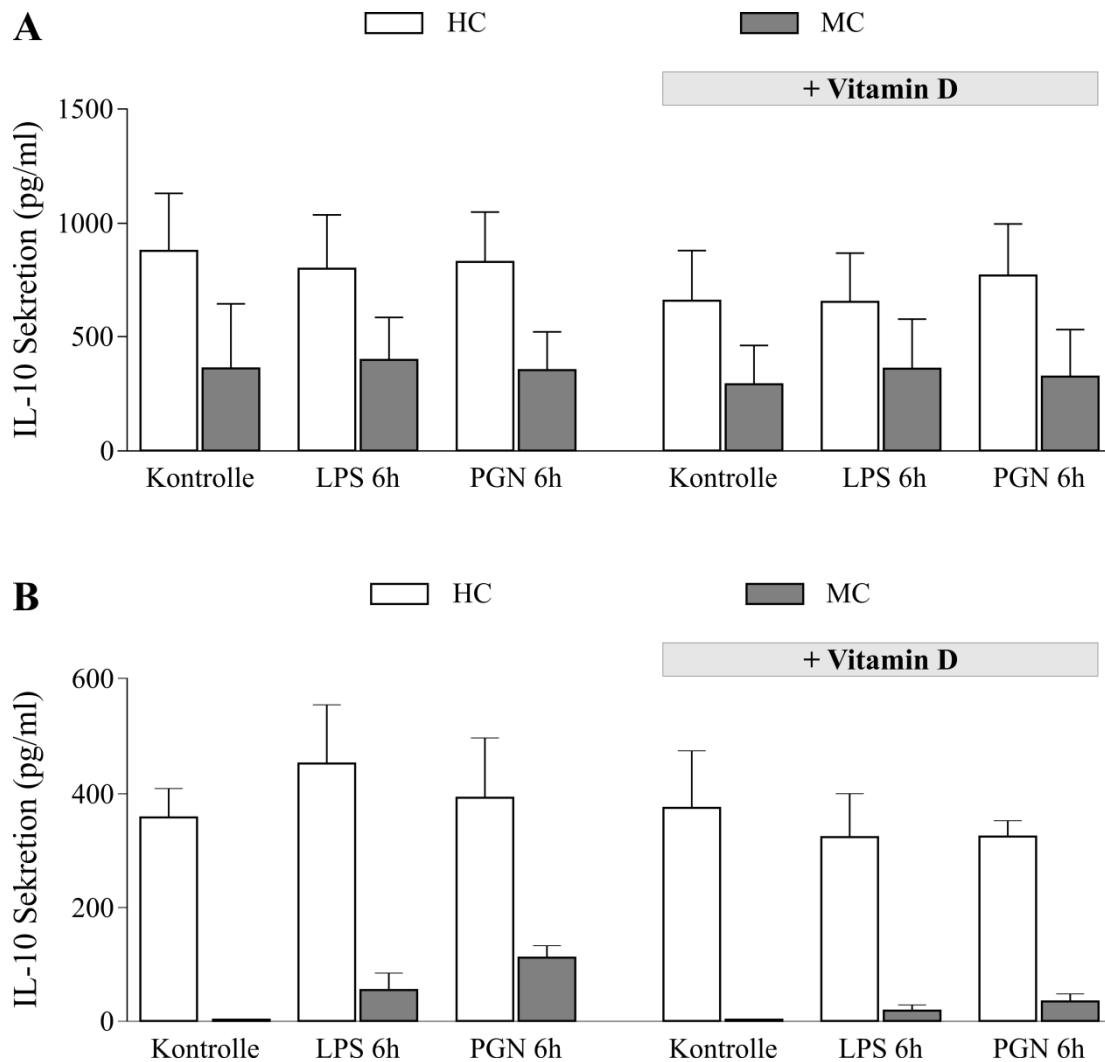


Abbildung 20: Effekt von Vitamin D auf die Sekretion von IL-10 bei PBMCs aus HC und MC-Patienten (A) Ergebnisse der Untersuchung mittels ELISA-Technik HC (n=6) und MC-Patienten (n=6). (B) Ergebnisse der LEGENDplex Methode. HC (n=3) und MC-Patienten (n=3). Die PBMCs aus HC und MC-Patienten wurden mit und ohne Vitamin D für 20 h behandelt und daran anschließend wurden LPS (6 h) oder PGN (6 h) zugegeben und alles über die angegebenen Zeiten co-inkubiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung gezeigt. Auf einen Signifikanztest wurde wegen der geringen Wiederholungen verzichtet.

Deutlich wird, dass die IL-10-Sekretion der PBMCs aus MC-Patienten, im Verhältnis zu den PBMCs aus Gesundkontrollen um ca. 50% geringer ist (ELISA, Abb. 20A). Das trifft sowohl auf die mit und ohne Vitamin-D co-stimulierten Zellen zu. Die Stimulation mit den NOD2-Liganden zeigte keinen signifikanten Effekt.

Unter Co-Stimulation mit Vitamin D zeigte sich eine Reduktion der IL-10 Sekretion bei den PBMCs der HC, wenngleich dieser Effekt nicht signifikant war.

In den Untersuchungen mit der LEGENDplex-Methode (Abb. 20B) zeigt sich, dass in den Kontrollen der Gesunden die Zellen, sowohl mit, als auch ohne Co-Inkubation mit Vitamin D, die IL-10 Konzentration in den Kulturüberständen wesentlich höher war, als bei den Zellen der MC Patienten (HC: Ko $358,2 \pm 50,68$ pg/ml; +Vitamin D: $374,8 \pm 100,3$ pg/ml). Auch in den Überständen der LPS oder PGN stimulierten Zellen der gesunden Kontrollen wurde wesentlich mehr IL-10 festgestellt als in den Proben der MC-Patienten. Die PBMCs der gesunden Kontrollen, die nur mit LPS (6 h) inkubiert wurden, scheinen etwas mehr IL-10 zu produzieren ($453,2 \pm 103,2$ pg/ml), als die Zellen unter Kontrollbedingungen. Durch die Co-Inkubation mit Vitamin D wird dieser Effekt etwas gehemmt ($323,3 \pm 76,6$ pg/ml). Ähnliches konnte für die Stimulation mit PGN ermittelt werden. Auch hier steigt bei den PBMCs der HC die IL-10 Konzentration nach 6 stündiger Stimulation mit PGN auf $392,7 \pm 105,1$ pg/ml leicht an, während die Vitamin D-Behandlung diesen Effekt geringfügig reduziert ($324,4 \pm 27,8$ pg/ml).

Für die Zellen der MC-Patienten wurden ähnliche Resultate ermittelt. Im Unterschied zu den Zellen aus den gesunden Kontrollen, wurden bei den Zellen aus den Erkrankten in den Kontrollen (ohne Liganden-Stimulation) keine IL-10 Sekretion ins Medium nachgewiesen. Die Ergebnisse lagen unter dem Detektionsniveau. Sowohl LPS-, als auch PGN-Stimulation bewirkten in den Zellkulturen der Erkrankten eine Erhöhung der IL-10 Produktion, die im Vergleich zu den Zellen aus den HC wesentlich geringer war. Die Behandlung mit Vitamin D verringerte diese induzierte IL-10 Produktion bei den Zellen aus den MC-Patienten (Ko: LPS $54,6 \pm 29,8$ pg/ml; +Vitamin D: $18,2 \pm 10,1$ pg/ml und bei PGN: Ko: $111,4 \pm 21,1$ pg/ml; +Vitamin D: $34,3 \pm 13,5$ pg/ml). Tendenziell vergleichbare Ergebnisse wurden aus den ELISA-Experimenten beobachtet. Die hemmenden Effekte von Vitamin D auf die Zellen aus den MC-Patienten wurden durch die LEGENDplex Experimente etwas deutlicher.

3.4.3 Wirkung von Vitamin auf die TNF- α Proteinsekretion bei HC und MC-Patienten

Dafür verwendeten wir die Bead-basierte LEGENDplex Methode. Damit kann gleichzeitig die Sekretion mehrerer pro-inflammatorischen Zytokine, wie z.B. IFN- γ und TNF- α analysiert werden. Diese Untersuchungen sollen eine komplettere Interpretation der pro-inflammatorischen Reaktion in den PBMCs ermöglichen.

Da die Gabe von TNF- α Blockern wie Infliximab eine der wichtigsten Säulen der Behandlung des Morbus Crohn darstellt (Vetter und Neurath, 2018), war ein Vergleich zwischen Transkriptions- und Translationsebene für dieses Zytokin besonders interessant. Die Bestimmung der TNF- α Konzentration in den Zellkulturüberständen ist dafür eine gute Möglichkeit.

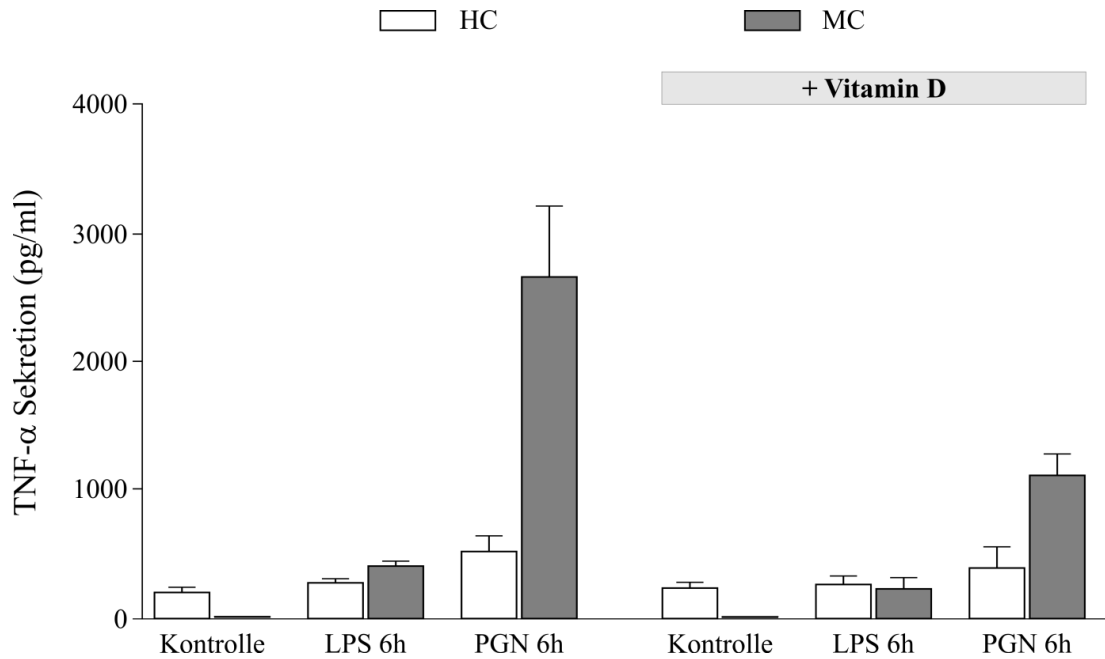


Abbildung 21: Effekt von Vitamin D auf die Sekretion von TNF- α bei PBMCs aus HC und MC-Patienten

Die PBMCs aus HC (n=3) und MC-Patienten (n=3) wurden mit und ohne Vitamin D für 20 h behandelt und daran anschließend wurden LPS (6 h) oder PGN (6 h) zugegeben und alles über die angegebenen Zeiten co-inkubiert.

Die Ergebnisse sind als Säulendiagramme \pm Standardfehler gezeigt. Auf einen Signifikanztest wurde wegen der geringen Wiederholungen verzichtet.

Die PBMCs der Gesunden sezernieren in den Kontrollen (ohne Vitamin D: $205,00 \pm 43,05$ pg/ml; mit Vitamin D: $240,4 \pm 44,54$ pg/ml) geringe Mengen an TNF- α . Die Zugabe von LPS für 6 h verändert die Sekretion nur geringfügig ($282,5 \pm 31,5$ pg/ml), während durch den Liganden PGN eine starke Zunahme an TNF- α ($615,9 \pm 124,8$ pg/ml) in den Kulturüberständen verursacht wird. Dieser Effekt des PGN scheint durch die Wirkung des Vitamin Ds leicht gehemmt zu werden ($585,9 \pm 211,8$ pg/ml) (Abb. 21). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in den Untersuchungen zur mRNA Expression von TNF- α in den PBMCs der gesunden Kontrollen gefunden (Abb. 10 und 14).

In den Kontrollen (mit und ohne Vitamin D) der Zellen aus den MC-Patienten konnte kein TNF- α nachgewiesen werden (unter der Detektionsgrenze). Die Sekretion wird aber durch die Liganden LPS ($412,4 \pm 38,7$ pg/ml) und PGN ($2682,0 \pm 557,7$ pg/ml) stark induziert. Vitamin D hemmt die LPS induzierte TNF- α Sekretion um ca. 40% ($235,1 \pm 88,0$ pg/ml). Demgegenüber reduziert Vitamin D die PGN-induzierte TNF- α Sekretion bei den Zellen aus den MC-Patienten um ca. 60% ($1124,0 \pm 169,7$ pg/ml). Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur mRNA Expression von TNF- α (Abb. 10 und 14).

3.4.4 Wirkung von Vitamin D auf die IFN- γ Proteinsekretion bei HC und MC-Patienten

Neben TNF- α ist auch IFN- γ ein pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin, das bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielt. Deshalb sollte untersucht werden, ob dessen Proteinsekretion durch die Wirkung von Vitamin D bei den PBMCs aus gesunden Kontrollen und MC-Patienten beeinflusst wird. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 22 dargestellt.

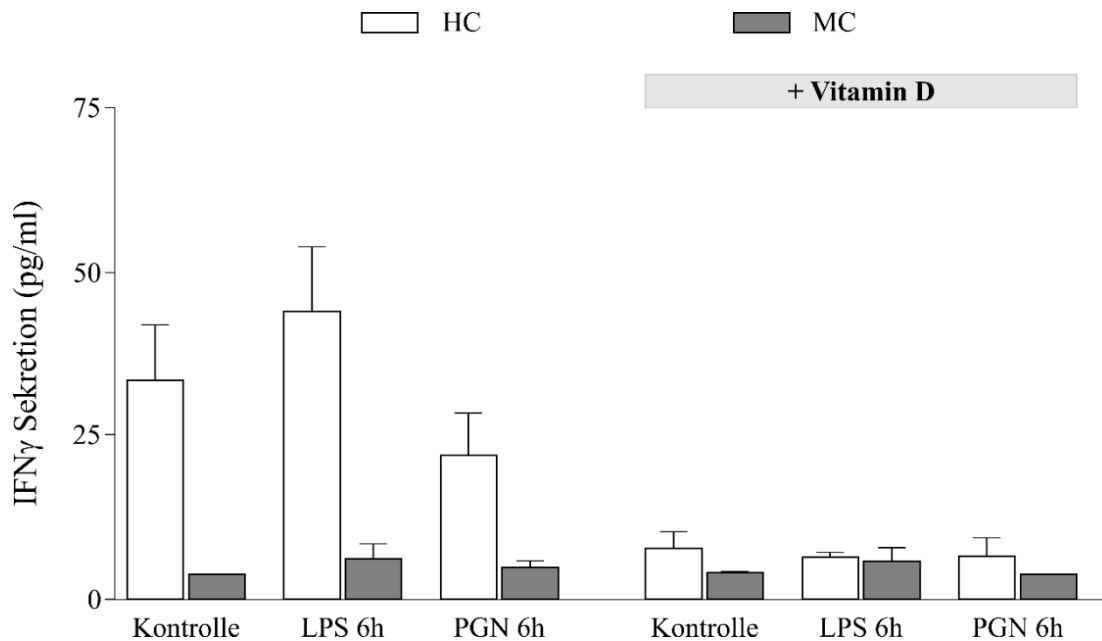


Abbildung 22: Effekt von Vitamin D auf die Sekretion von IFN- γ bei PBMCs aus HC und MC-Patienten. Die PBMCs aus HC (n=3) und MC-Patienten (MC, n=3) wurden mit und ohne Vitamin D für 20 h behandelt und daran anschließend wurden LPS (6 h) oder PGN (6 h) zugegeben und alles über die angegebenen Zeiten co-inkubiert.

Die Ergebnisse sind als Säulendiagramme \pm Standardfehler gezeigt. Auf einen Signifikanztest wurde wegen der geringen Wiederholungen verzichtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass in den Zellen der HC wesentlich mehr IFN- γ ($33,7 \pm 8,6$ pg/ml) nachgewiesen wurde als in den Zellen aus den MC-Patienten ($3,87 \pm 0$ pg/ml). Dabei scheint die LPS Co-Stimulation die Sekretion bei den gesunden Kontrollen sogar noch zu verstärken ($44,4 \pm 9,9$ pg/ml), während PGN ($22,2 \pm 6,5$ pg/ml) einen reduzierenden Einfluss zu haben scheint. Bei den Zellen aus den MC-Patienten ist dieser Effekt eher nicht zu beobachten (LPS: $6,2 \pm 2,3$ pg/ml; PGN: $4,9 \pm 1,0$ pg/ml).

Die Behandlung der Zellen mit Vitamin D bewirkte bei den PBMCs aus den gesunden Kontrollen eine starke Hemmung der IFN- γ Sekretion bis zu $>70\%$ (Ko: $7,9 \pm 2,5$ pg/ml; LPS: $6,6 \pm 0,7$ pg/ml und PGN: $6,7 \pm 2,8$ pg/ml). Bei den Zellen aus den MC-Patienten ändert die Vitamin D Behandlung die IFN- γ Sekretion zahlenmäßig nicht.

4 Diskussion

Die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wie CU und MC ist weiterhin noch nicht in ihrer Gesamtheit verstanden. Immer mehr Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine Beeinträchtigung der Immunantwort und der Barrierefunktion der Darmmukosa eine bakterielle Translokation und Entzündung der Mukosa zur Folge haben.

Umweltfaktoren sind sowohl an der Entstehung als auch beim klinischen Verlauf von CEDs von Bedeutung. Dazu zählt Vitamin D, das bei Versorgungsdefiziten im Zusammenhang mit der Pathogenese von CEDs steht (Ananthakrishnan et al., 2012; Schäffler et al., 2018a; Caviezel et al., 2018; Ko et al., 2018). Vitamin D besitzt wegen seiner immunmodulierenden Eigenschaften positive Wirkungen auf intestinale Entzündungen und in dem Zusammenhang auch auf die Mikrobiota des Darms (Cantorna et al., 2004; 2015; Schäffler et al., 2018c). Damit kann Vitamin D als Regulator des angeborenen und des erworbenen Immunsystems angesehen werden. Unklar ist jedoch, ob Vitamin D einen direkten Effekt auf die Immunantwort und die Mikrobiota hat oder ob die Veränderungen der Mikrobiota als Sekundäreffekt auf die positive Wirkung auf das Immunsystem anzusehen sind.

Daneben steht der intrazellulär lokalisierte *pattern recognition receptor* NOD2 eng in Verbindung mit der Pathogenese des Morbus Crohn. Er erkennt und bindet Komponenten der bakteriellen Zellwand wie MDP und PGN wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird. Mutationen im *NOD2*-Gen mit nachfolgender Dysfunktion beeinträchtigen die Entfernung von Bakterien und stellen einen wichtigen Risikofaktor bei der Entwicklung und dem Verlauf von MC dar.

Prinzipiell wird empfohlen, ein Vitamin D Defizit bei CED Patienten auszugleichen. Vitamin D könnte neben seinem Einfluss auf den Calcium/Phosphat-Stoffwechsel darüber hinaus wegen der immunmodulierenden Effekte als zusätzliche Therapieform bei MC-Patienten von Interesse sein. Bisher gibt es wenige Erkenntnisse zur Wirkung von Vitamin D auf die Krankheitsaktivität bei MC-Patienten. Um die Effekte des Vitamin D auf die Immunantwort besser verstehen zu können, wurden in die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit PBMCs, die eine Rolle bei der Immunantwort spielen (Zhou et al. 2009), einbezogen. Analysiert wurde die Wirkung von Vitamin D auf die Expression von pro- bzw. anti-inflammatorisch wirkenden Zytokinen bei PBMCs aus gesunden Kontrollprobanden und MC-Patienten, um mögliche Unterschiede zu identifizieren.

4.1 Genexpression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in PBMC von gesunden Kontrollen und Morbus Crohn Patienten

Im ersten Teil der Arbeit wurden PBMC aus HC und MC-Patienten in Anwesenheit von NOD2-Liganden (MDP, P3C, PGN) und LPS inkubiert und mittels RT-PCR die Genexpression von repräsentativen immunmodulatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-10) untersucht. Ergebnisse von Dionne et al. (2017) zeigten, dass die Stimulation des NOD2-Rezeptors durch PAMPs einen Effekt auf die Expression von Zytokinen in PBMCs hat.

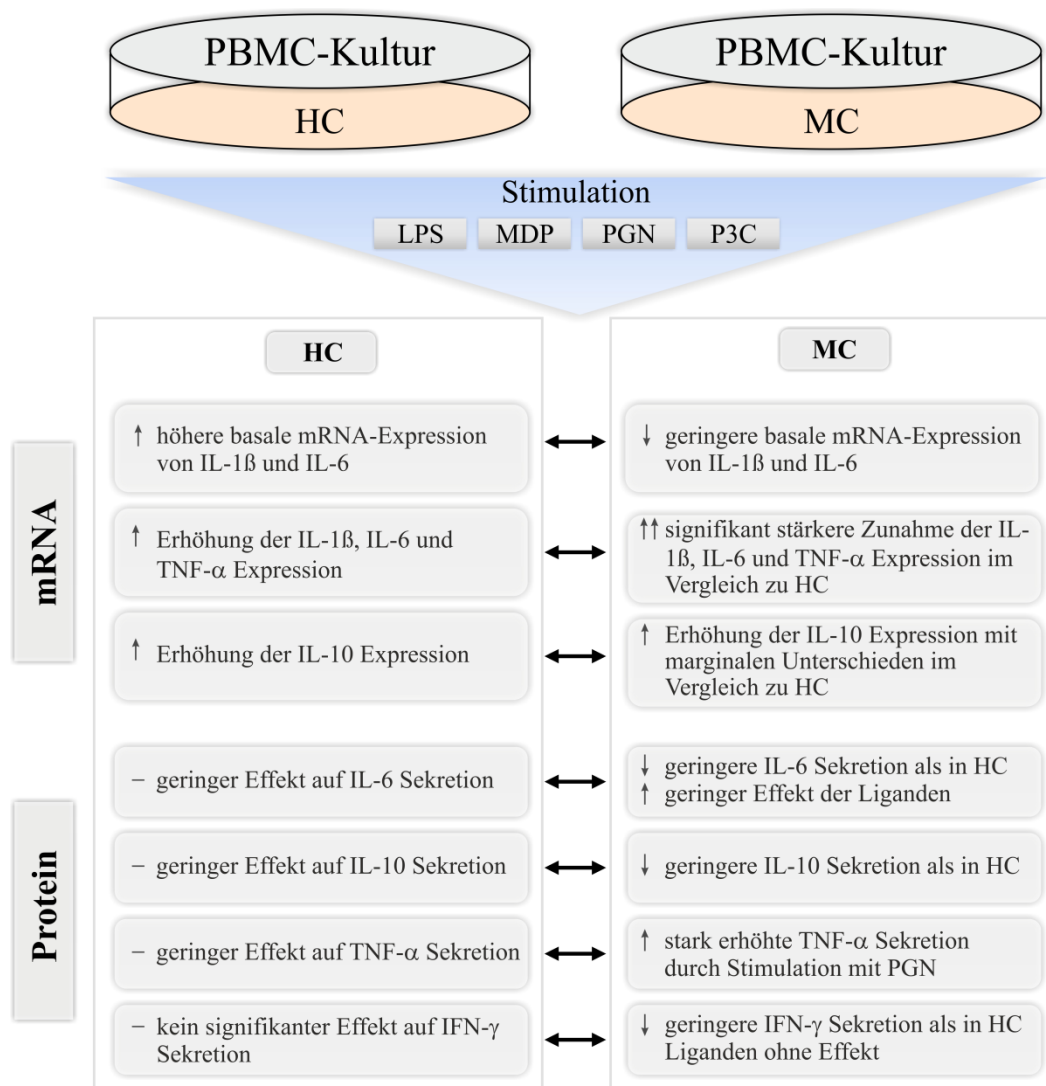


Abbildung 23: Fließschema zur Erläuterung der Kernergebnisse aus den Untersuchungen zum Zytokinprofil aus HC und MC

4.1.1 Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in Morbus Crohn Patienten

Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen zeichneten ein differenziertes Bild. Eine Übersicht hierzu ist in Abbildung 23 dargestellt. Untersuchungen von Dionne et al. (2017) zeigten, dass die Stimulation des *NOD2* Rezeptors durch PAMPs einen Effekt auf die Expression von Zytokinen in PBMCs hat.

Besonders wichtig im Hinblick auf das Verhalten der PBMCs war die Betrachtung der Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α . IL-1 β spielt eine kritische Rolle in der Pathogenese von CEDs. Es wird von Zellen aus Geweben des Intestinaltraktes und Makrophagen aus CED-Patienten sezerniert und der Gehalt korreliert mit der Schwere der Erkrankung (Ligumsky et al., 1990, Reinecker et al., 1993). Eine erhöhte Sekretion von IL-1 β wurde in PBMC aus MC-Patienten nachgewiesen (Satsangi et al., 1987). Ähnliche Ergebnisse wurden von Schwarzmaier et al. (2013) mit PBMCs aus MC-Patienten im Stadium der klinischen Remission beschrieben. Im Serum von Patienten mit akutem MC wurden ebenfalls erhöhte IL-1 β -Spiegel nachgewiesen (Blaschke et al., 2018).

IL-6 zählt ebenfalls zur Gruppe der pro-inflammatorischen Zytokine mit wichtigen Funktionen im Bereich der angeborenen und erworbenen Immunantwort. Es wird von verschiedenen Zelltypen, z.B. T- und B-Zellen, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten produziert. Dysregulierte IL-6 Level sind mit Immunerkrankungen verbunden, zu denen auch der MC zählt (Nishimoto und Kishimoto 2006; Yamamoto et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl die IL-1 β als auch die IL-6-Genexpression der PBMCs aus MC-Patienten durch die Liganden LPS, P3C und PGN stark erhöht wurde. Im Vergleich zu PBMCs aus gesunden Kontrollen war die mRNA Menge der beiden pro-inflammatorischen Zytokine bei den PBMCs aus MC-Patienten signifikant höher (Abb. 8 und 9). Die IL-6 mRNA Expression wurde im Vergleich zur IL-1 β - und TNF- α -Genexpression am stärksten durch die Liganden beeinflusst. Das korreliert mit Untersuchungen von Blaschke et al. (2018), die im Serum von MC-Patienten eine ca. 100-fache Erhöhung des IL-6 Gehaltes nachweisen konnten, während der Gehalt an IL-1 β und TNF- α ~10-fach anstieg. Weiterhin unterstützen diese Ergebnisse bezüglich IL-1 β die Resultate von Satsangi et al. (1987) und Schwarzmaier et al. (2013) auf der Ebene der Transkription. Untersuchungen von Schwarzmaier et al. (2013) deuten darauf hin, dass Defekte in angeborenen Immunmechanismen eher in der (entzündeten) Darmmukosa als im peripheren Blut eine Rolle spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch vermuten, dass auch Zellen des peripheren Blutes aus MC-Patienten

verstärkt IL-1 β exprimieren, wodurch inflammatorische Prozesse begünstigt und verstärkt werden könnten. Dies spricht für die Wahl von PBMCs als geeignetes Modell im Rahmen von translationalen Forschungsansätzen.

Um die Hypothese von einer erhöhten Expression pro-inflammatorischer Zytokine bei MC im Vergleich zu HC weiter zu überprüfen, blieb eine Betrachtung von TNF- α unerlässlich. Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α ist ein wesentlicher Vermittler der Immunantwort nach Kontakt mit Mikroben bzw. Gewebeschädigungen (Brown und Mayer, 2007). Antikörper gegen TNF- α bilden eine wichtige Säule im Therapiealgorithmus der CED. Das Zytokin wird hauptsächlich von Lymphozyten und aktivierten Monozyten/Makrophagen aber auch von anderen Zelltypen produziert (Peake et al., 2013). Es verringert auch die Expression von *tight junction* Proteinen wodurch die Barrierefunktion der Darmmukosa geschädigt wird. Bei Patienten mit CED ist die TNF- α Konzentration in der Darmmukosa, im Serum und im Stuhl erhöht (Oleson et al., 2016; Blaschke et al., 2018).

Ähnlich der Ergebnisse für IL-1 β und IL-6, wurde in PBMCs von MC-Patienten nach Stimulation mit einem Liganden eine verstärkte TNF- α Expression im Vergleich zu den PBMCs von Gesunden nachgewiesen (Abb. 10 und 14). Dies bestätigt die Ergebnisse von Dionne et al. (2014), welche eine Steigerung der TLR-induzierten TNF- α Expression feststellten. Jedoch war das Level der TNF- α mRNA Induktion bei den MC-Patienten geringer als das von IL-1 β und IL-6. Für den festgestellten zeitlichen Verlauf der LPS-Stimulation könnte es sich um einen Gewöhnungseffekt handeln. Eine mögliche Erklärung für den geringeren Unterschied in den TNF- α Expressionsmustern von HC- und MC-PBMCs, lässt sich darauf zurückführen, dass viele der rekrutierten MC-Patienten über lange Zeiträume mit TNF- α Inhibitoren wie Infliximab (Remicade) bzw. Adalimumab (Humira) behandelt wurden.

4.1.2 Proteinsekretion pro-inflammatorischer Zytokine

Generell zeichnete sich somit eine stärkere Induktion der pro-inflammatorischen Zytokinexpression nach Stimulation der PBMCs von MC im Vergleich zu HC ab. Dieses Muster galt es auf Proteinebene zu überprüfen. Hierzu wurde die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-6 analysiert. Für IL-6 und TNF- α diente dies gleichzeitig zur Validierung der Ergebnisse der Genexpression.

Die Sekretion von IL-6 unterscheidet sich bei den PBMCs aus MC-Patienten deutlich von denen der Gesundkontrollen. Besonders in den unstimulierten Zellen der MC-Patienten war die

IL-6 Sekretion geringer als bei den Zellen aus den gesunden Kontrollen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den erhobenen mRNA-Expressionsdaten. Dennoch könnte dieses Muster auf die chronische Inflammation der Patienten mit MC hindeuten. Eine Erklärung für diesen schwierig zu interpretierenden Effekt könnte die Arbeit von Smith et al. (2009) liefern. Sie beschreiben, dass in MC-Makrophagen ein großer Anteil von Zytokinen eher in den Lysosomen abgebaut als sezerniert wird, wodurch es zu einer Beeinträchtigung der Beseitigung von Bakterien kommt. Um potenziell veränderte postranskriptionell regulatorische Prozesse, welche die verringerte IL-6 Proteinexpression in MC-PBMCs erklären könnten, müssten sich weitere Untersuchungen diesbezüglich anschließen. Auch könnten so, die aufgrund der geringen Kohorten-Größe statistisch schwer zu stützenden Ergebnisse validiert werden. Während sich das IL-6 Sekretionsniveau der PBMCs der Gesundkontrollen nach Stimulation mit LPS und PGN kaum ändert, reagieren die PBMCs der MC-Patienten im Rahmen der normalen Immunantwort mit einer verstärkten Sekretion von IL-6 (Abb. 19). Auch dies könnte ein Hinweis auf die gestörte Immunreaktion bei MC sein, welche zum Beispiel bei Segal (2019) beschrieben wird. Dies könnte schlussendlich ein Hinweis auf die in MC-Patienten gestörte Immunantwort sein. Die Ergebnisse bedürfen ebenfalls einer Validierung durch weiterführende Untersuchungen. Vor allem sollte hier ein Augenmerk auf die Stimulationszeit der PBMCs gelegt werden. Damit könnte die zwischen translationalen und transkriptionellen Prozessen gelegene zeitliche Komponente als Ursprung der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der mRNA-Expression und denen der Proteinsekretion ausgeschlossen werden.

Auch IFN- γ wird von den PBMCs aus den gesunden Kontrollen im Vergleich zu den Zellen aus den MC-Patienten wesentlich stärker sezerniert (Abb. 22). Nur die Stimulation mit PGN scheint eine Reduktion der IFN- γ Sekretion zu bewirken. Um die Aussagen bezüglich IL-6 und IFN- γ zu bekräftigen, sind auch hier weitere Versuche nötig. Ggf. könnte die Verlängerung der Stimulationszeit mit diesem TLR-Agonisten eine erhöhte Sekretion der beiden Zytokine in den PBMCs auslösen. Aufgrund der ähnlichen Diskrepanz bei IL-6 und IFN- γ scheint ein methodischer Fehler jedoch weniger wahrscheinlich. In den zukünftigen Untersuchungen sollte besonderer Wert auf die Rekrutierung von MC-Patienten unter Immunsuppressiver Therapie und Patienten ohne Immunsuppression gelegt werden. In dieser Studie flossen aufgrund der kleinen untersuchten Kohorte MC-Patienten in Remission und unter Remicade-Therapie ein. So haben TNF- α und IFN- γ selbst einen *NOD2* induzierenden Effekt und erhöhen dadurch die Sukzeptibilität von Darmmukosa Epithelzellen für LPS (Rosenstiel et al., 2003). Dieser Effekt konnte auch für periphere Monozyten nachgewiesen werden (Gutierrez et al., 2002). Die

immunsuppressive Therapie mittels TNF- α -Inhibition könnte das pro-inflammatorische Reaktionsmuster der PBMCs längerfristig auf die zur Stimulation eingesetzten Bakterienbestandteile beeinflusst haben. Eine schnellere Hochregulation der Genexpression wäre schließlich eine mögliche Ursache für die festgestellte Diskrepanz zwischen prä- und posttranslationaler Ebene darstellen. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass auf eine transkriptionelle Veränderung nicht zwingend eine entsprechende translationale Antwort folgt. Ursachen dafür liegen bei vielfältigen Mechanismen, die die Proteinsynthese regulieren.

Für TNF- α zeigte sich wiederum ein unterschiedliches Sekretionsmuster. Die Zellen der gesunden Kontrollen sezernierten geringe Mengen an TNF- α , die durch die Liganden (LPS oder PGN; Abb. 21) nur geringfügig verstärkt wurde. Demgegenüber konnte in den Kulturüberständen aus den unbehandelten Kontrollen der MC-Patienten kein TNF- α nachgewiesen werden (Abb. 21). Nach Stimulation mit LPS und mit PGN konnte deutlich mehr TNF- α in den Überständen von MC festgestellt werden als in denen von HC-PBMCs. Dieses Phänomen kann aufgrund der Dysregulation der Immunreaktion in Morbus Crohn Patienten erklärt werden und stimmt mit den Ergebnissen der TNF- α mRNA-Expression überein.

4.1.3 IL-10 Expression und Sekretion in Morbus Crohn Patienten

IL-10 wird als anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin als besonders wichtig für die Immunantwort im Menschen betrachtet (Glocker et al., 2011). Es wird von verschiedenen Zelltypen, wie B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und Mastzellen produziert. IL-10 hat regulierende Funktionen auf die Immunhomöostase des Darms. Geringe IL-10 Level im Serum erhöhen die Schwere der MC-Erkrankung im Vergleich zu hohen IL-10 Werten, die möglicherweise positive Effekte bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen haben könnten (Marlow et al., 2013).

Als Resultat aus den durchgeführten Untersuchungen wurden nur geringe Unterschiede in der IL-10 Expression zwischen PBMCs von MC-Patienten und gesunden Probanden nachgewiesen. Nur nach Stimulation mit MDP zeigte sich eine deutliche Verringerung der IL-10 mRNA bei den PBMCs aus den MC-Patienten. Vergleichbare Ergebnisse bzgl. MDP und IL-10 wurden auch von Verschoor et al. (2015) beschrieben. Diese Autoren konnten zeigen, dass in älteren Patienten der IL-10 Gehalt negativ mit der Konzentration an zirkulierendem MDP korreliert.

Das höhere Durchschnittsalter der MC-Patienten im Vergleich zu den Gesundkontrollen könnte somit einen Einfluss auf die in unseren Ergebnissen abgebildete Tendenz haben. Trotzdem ist zu erwähnen, dass die Informationen zu IL-10 Serumgehalten bei CED-Patienten in der Literatur widersprüchlich sind. Beschrieben werden erhöhte IL-10 Werte bei MC- und CU-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Wang et al., 2011; Kucharzik et al., 1995). Andererseits werden auch erhöhte IL-10 Mengen bei Patienten mit CU aber nicht mit MC, sowie keinerlei Unterschiede zwischen Erkrankten und Gesunden beschrieben (Mitsuyama et al., 2006; Nielsen et al., 1996). Aber auch von signifikant verringerten IL-10 Mengen bei spezifischen MC-Patienten wird berichtet (Correa et al., 2009).

Trotz dieser widersprüchlichen Studienergebnisse wurde über IL-10 Gaben als alternative Behandlung nachgedacht. Eingesetzt wurde dafür ein rekombinantes humanes IL-10 Präparat (Tenovil). Im Ergebnis verschiedener Studien zu diesem Thema wurden klinische Verbesserungen aber auch keine signifikanten Effekte beschrieben (Übersicht bei Marlow et al., 2013). Marlow et al. (2013) schlussfolgern daraus, dass IL-10 allein die pro-inflammatorischen Mediatoren, die die chronischen Entzündungen bei MC verursachen, nicht supprimieren kann. Somit wäre es als Therapeutikum für MC-Patienten wegen der Heterogenität der Erkrankung eher ungeeignet. Trotzdem könnten einige Patienten von einer IL-10 Therapie profitieren. Vor allem von einer Kombination aus anti-inflammatorischen Zytokinen, könnte sich für die Patienten ein therapeutischer Benefit ergeben (Kucharzik et al., 1997).

Um diese komplexen Erkenntnisse zu überprüfen, sollten die Untersuchungen zur IL-10 Proteinexpression ein klareres Bild zeichnen. Hierbei zeigte sich ein deutlich höheres Niveau der IL-10 Sekretion in den PBMCs der klinisch gesunden Kontrollen im Verhältnis zu den PBMCs der rekrutierten MC-Patienten (Abb. 20). Durch Stimulation mit LPS, oder PGN stiegen jedoch die IL-10 Sekretionsniveaus aus MC an, während deren IL-10 Sekretion konstant blieb. Dieses Muster wird sowohl durch die von uns durchgeführte LEGENDplex-Methode als auch im IL-10 ELISA bestätigt, was wiederum gegen einen methodischen Fehler spricht. Der Unterschied der IL-10 Basissekretion, als auch in der Reaktion auf die Stimulation mit Liganden zeigt eine vermutliche Dysbalance der pro-und anti-inflammatorischen Zytokine in MC-Patienten. Hier wäre wiederum eine Wiederholung des verwendeten Zellkulturmodells von Interesse. Ließe sich durch die Verlängerung der Stimulationszeit mit LPS und PGN, bzw. mit einer höheren Dosis eben jener Liganden ebenfalls ein Anstieg der IL-10 Sekretion in HC PBMCs feststellen, so könnte dies für eine übermäßige Reagibilität der PBMCs aus MC sprechen. Ein genauer Erklärungsansatz für den Unterschied zwischen HC und MC Daten lässt sich aber durch die von uns erhobenen Daten zum jetzigen Zeitpunkt nicht formulieren.

4.2 Einfluss von Vitamin D auf das Zytokinprofil in PBMCs von gesunden Kontrollen und MC-Patienten

Vitamin D hat sowohl einen Einfluss auf das angeborene als auch auf das erworbene Immunsystem. Seine immunmodulierende Wirkung und dessen Einfluss auf verschiedene Erkrankungen des Immunsystems sind Ziel aktueller Forschungsarbeiten (Garg et al., 2012; Hewison, 2012).

So konnten positive Effekte von Vitamin D auf den Krankheitsverlauf bei CED Patienten in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Die Apoptose epithelialer Zellen ist ein physiologischer Prozess im Gastrointestinaltrakt, bei dem die Barrierefunktion der Mukosa erhalten bleibt. Bei MC-Patienten führt die Zytokin-induzierte Apoptose jedoch zu einer abnormalen Permeabilität der Mukosa. In einem Vitamin D-defizienten Mausmodell wurde eine Störung/Dysfunktion der Darmbarriere durch invasive *E.coli* bzw. durch induzierte Colitis nachgewiesen (Assa et al., 2015). Eine mit *E.coli* bzw. LPS *in vitro* induzierte Schädigung humaner Darmzellen konnte durch Applikation von Vitamin D reduziert werden (Chen et al., 2015). Regulierende und protektive Wirkungen auf die *tight-junction* Proteine und die Apoptose der Zellen der Darmbarriere wurden nachgewiesen (Stio et al., 2016; He et al., 2018). Lei et al. (2018) konnten an einem Colitis-Maus-Modell zeigen, dass das Vitamin D Rezeptor (VDR)-Signaling durch die Hemmung der Apoptose der Epithelzellen die Entzündung der Mukosa reguliert

Um den Einfluss von Vitamin D auf die Genexpression immunrelevanter Zytokine zu testen, wurden PBMCs mit Vitamin D vorinkubiert und anschließend mit den TLR-, bzw. NOD2-Liganden stimuliert. Diese Resultate wurden mit den Ergebnissen der PBMCs ohne Vitamin D Behandlung verglichen. Dabei zeigten sich Hinweise, inwieweit Vitamin D einen Einfluss auf Krankheiten des Immunsystems haben könnte. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von Vitamin D sind in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

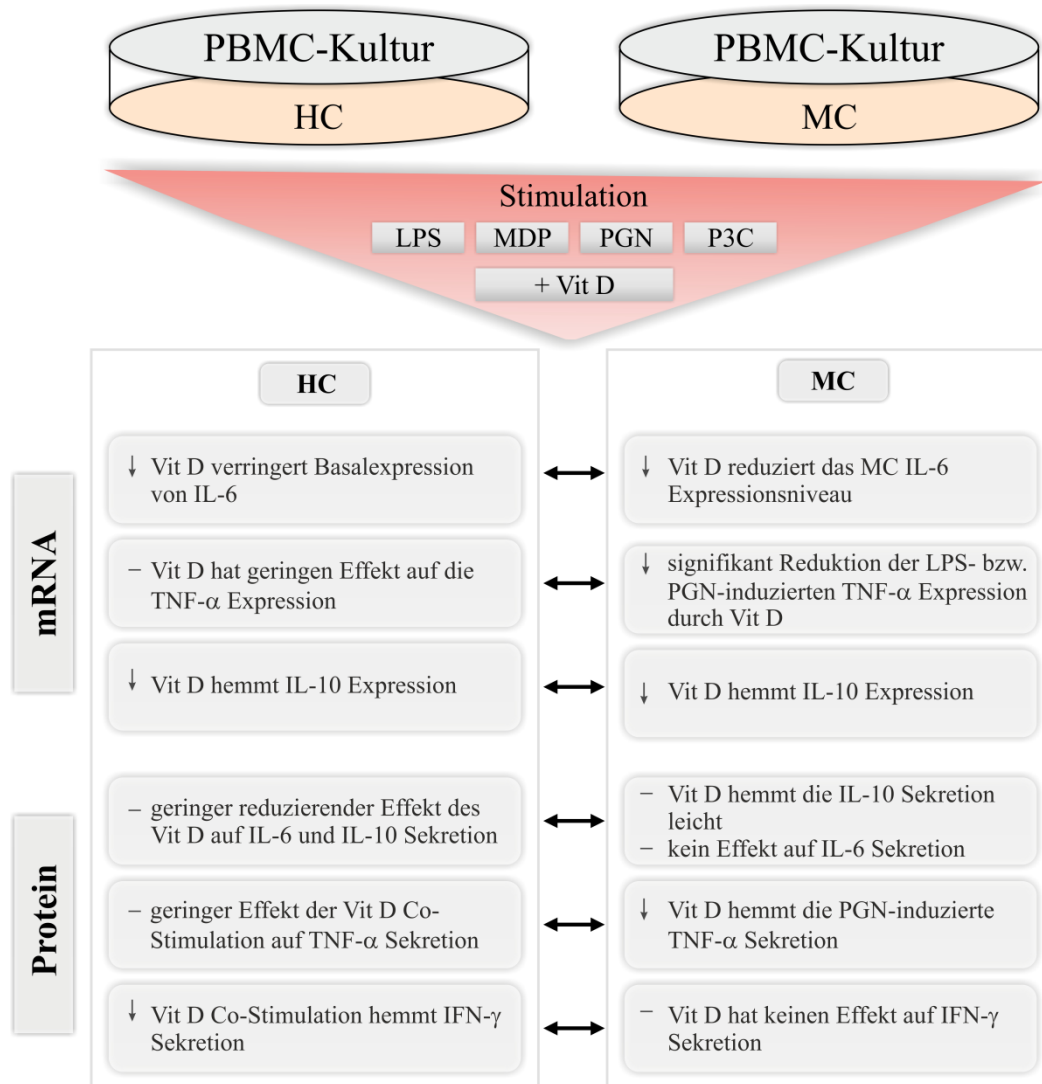


Abbildung 24: Fließschema zur Erläuterung der Kernergebnisse aus den Untersuchungen zur Vitamin D Co-Stimulation

Für die Genexpression von IL-1 β konnten durch die Vorinkubation mit Vitamin D weder bei den gesunden Kontrollen noch bei den MC-Patienten signifikante Unterschiede festgestellt werden, was darauf hinweist, dass unter den hier gewählten Bedingungen die IL-1 β Expression nicht durch Vitamin D beeinflusst wird. Verway et al. (2013) beschreiben sogar eine Zunahme der IL-1 β mRNA und der IL-1 β Sekretion durch Vitamin D bei *Mycobacterium tuberculosis* infizierten Makrophagen, verursacht durch eine direkte Regulierung über das VDR-Signaling. Sie fanden weiterhin, dass die modulierende Wirkung des Vitamin D die angeborene Immunantwort auch indirekt über parakrine Signalwege beeinflusst.

Die Genexpression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α wurde hingegen maßgeblich bei den PBMCs aus den MC-Patienten durch die Vorbehandlung mit Vitamin D reduziert.

Für die IL-6 Genexpression war der Unterschied mit und ohne Vitamin D Vorbehandlung in den Kontrollzellen aus den MC-Patienten signifikant (Abb. 13B). Bemerkenswert ist, dass eine Vitamin D Vorbehandlung (Abb. 9B) die signifikanten Differenzen zwischen HC und MC (Abb. 9A) nivellierte. Die Ergebnisse könnten auf einen positiv regulatorischen Effekt der Immunreaktion bei den MC-Patienten durch die Vitamin D-Behandlung hindeuten.

Ein deutlicher Effekt des Vitamin Ds wurde auf die Expression der TNF- α mRNA bei den PBMCs aus den MC-Patienten festgestellt. Durch Vitamin D Vorstimulation, kam es im Vergleich zu den Zellen ohne Vitamin D Vorbehandlung zu einer Reduktion der Expression bei den mit LPS und PGN-stimulierten Zellen. Verantwortlich dafür könnte die immunmodulierende und inflammationshemmende Wirkung von Vitamin D sein (Hewison, 2012; Gubatan und Moss, 2018). Dionne et al. (2017) berichten über eine Reduktion der TNF- α Proteinexpression durch Vitamin D Stimulation bei M1 Makrophagen von MC-Patienten, was durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen auf RNA-Ebene prinzipiell bestätigt werden kann.

Für die Stimulation mit MDP könnte ebenfalls ein TNF- α hemmender Einfluss der Vitamin D Co-Stimulation vermutet werden. Diese Beobachtung wiederum widerspricht den Daten von Dionne et al. (2017), welche ein erhöhtes TNF- α Expressionsniveau bei Co-Stimulation mit MDP und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D feststellten. Grundlegend hierfür wird die NOD2-Rezeptor Induktion durch Vitamin D und die daraufhin erhöhte Reagibilität der Zelle auf NOD2-Rezeptor Agonisten wie MDP verantwortlich gemacht. Da in unserem Zellkulturmodell eine Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ MDP erfolgte, während bei den Arbeiten von Dionne et al. 5 $\mu\text{g/ml}$ verwendet wurden, erscheint eine Unterstimulation als Grund für diese Diskrepanz ausgeschlossen. Um somit unsere Resultate statistisch zu validieren und weiterhin vergleichen zu können, wäre eine Vergrößerung der untersuchten Kohorte vonnöten. Hierbei könnten schließlich wichtige Erkenntnisse über die Wirkungsweise des VDR bzw. des NOD2-Rezeptors gewonnen werden.

Um einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der immunreaktiven Prozesse zu erhalten, erfolgte die Stimulation mit LPS über unterschiedliche definierte Zeiträume. Der teilweise modulierende Effekt von Vitamin D auf die IL-1 β - bzw. IL-6-Basalexpression in den Kontrollen, scheint durch die Wirkung der Liganden aufgehoben zu werden. Aus dem zeitlichen

Verlauf der LPS-Stimulation lässt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Einfluss von Vitamin D auf die IL-1 β - und IL-6-Expression ableiten.

Ein etwas differentes Bild des zeitlichen Stimulationsverlaufes ergab die Expression von TNF- α . Die immunmodulatorische Wirkung von Vitamin D zeigte sich nicht nur in den Zellkulturen ohne NOD2-Liganden. Für eine Stimulation mit LPS 2 h wurde in MC-PBMCs eine signifikant geringere TNF- α Expression nach Vitamin D Co-Stimulation ermittelt. Im zeitlichen Verlauf der LPS-Stimulation verringerte sich dieser Effekt (6 h) und war nach 24 h nicht mehr nachweisbar.

Ein hierbei zugrundeliegender Erklärungsansatz ist in der Literatur schwer auszumachen. Möglicherweise spielen Adaptationsmechanismen des NOD2-Rezeptors, oder eine „Booster“-ähnliche Wirkung des Vitamin D Rezeptors eine Rolle. Um diesen Sachverhalt genauer zu überprüfen, wären weitere Untersuchung des Zeitverlaufes im Sinne einer Kinetik interessant. Besonders gelte es herauszustellen, inwiefern eine Stimulation mit P3C über 6 h hinaus das Expressionsverhalten bezüglich pro-inflammatorischer Zytokine verändert.

Für die Stimulation mit MDP könnte ebenfalls ein TNF- α hemmender Einfluss der Vitamin D Co-Stimulation zu vermuten sein. Für die Stimulation mit PGN ist diese Tendenz eindeutiger. Die Ergebnisse deuten demnach auf eine hemmende Wirkung des Vitamin Ds auf die TNF- α Expression hin. Dies weist darauf hin, dass Vitamin D durch die Reduktion der TNF- α Expression bei den PBMCs einen schützenden Effekt vor immunologischen Reaktionen haben könnte. Somit könnte es die Wirkung der heutzutage in der Klinik breit eingesetzten TNF- α Inhibitoren unterstützen. Letztendlich ist aufgrund der Komplexität der immunologischen Prozesse jedoch eine Extrapolation der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse auf eine *in vivo* Situation als schwierig zu betrachten.

Für das anti-inflammatorisch wirkende IL-10 zeigte die Co-Stimulation mit Vitamin D in den PBMCs einen inhibitorischen Einfluss auf die Genexpression. Die Vorinkubation mit Vitamin D reduzierte die LPS-induzierte IL-10 Expressionsniveau signifikant ($p < 0,05$). Das betraf sowohl die PBMCs aus HC als auch jene aus MC. Aufgrund der bekannten immunsupprimierenden Wirkung von Vitamin D, scheint diese Beobachtung zunächst paradox. Auch nach Stimulation mit TLR-Liganden resultierte die Co-Stimulation mit Vitamin D in einer reduzierten Expression von IL-10, was eine methodische Erklärung unwahrscheinlich macht. Die Ergebnisse scheinen vereinbar zu sein mit den Daten von Matileinen et al. (2010). Diese Autoren zeigten, dass zu Beginn der Stimulation mit Vitamin D, das Expressionsniveau von IL-10 absinkt und nach über 48 h der Stimulation schlussendlich ansteigt, sodass Vitamin D seinen anti-inflammatorischen Charakter entfaltet. In unseren Versuchen wurden Stimulationszeiten von

maximal 24 h gewählt, sodass aufgrund dessen eine mögliche Induktion der IL-10 Genexpression nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse der Taqman Untersuchungen zum Vitamin D Einfluss müssen auch im Zusammenhang mit den Ergebnissen zur Untersuchung der Proteinsekretion betrachtet werden. Dabei zeigte sich ein Unterschied im Verhalten von HC und MC PBMCs. Die gewählten Kulturbedingungen unter Vitamin D hatten keinen Einfluss auf die IL-6 Sekretion der PBMCs aus CED Patienten, während in den Überständen der PBMCs der Gesundkontrollen durch die Vitamin D Co-Stimulation eine Reduktion an IL-6-Protein festgestellt wurde. Somit zeigt sich eine Divergenz zwischen IL-6 Genexpression und IL-6 Sekretion. Unsere Untersuchungen zeigten einen geringeren Einfluss von Vitamin D auf die IL-6 Genexpression als auf die IL-6 Sekretion. Dies legt die Vermutung nahe, dass Vitamin D auch auf die extranukleäre bzw. posttranslationale Regulation der PBMC-Antwort einen Einfluss hat.

Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Bendix-Struve et al. (2010). In deren Studie wurden MC-Patienten 1200 IE/Tag Vitamin D für ein Jahr verabreicht. Damit wurde eine Erhöhung des Vitamin-D Levels um 70 nmol/l erreicht, während der Vitamin D Spiegel der Placebo-Gruppe nicht signifikant sank. Nach 26 Wochen wurde eine signifikant verstärkte IL-6-Produktion aus T-Zellen von Patienten mit Vitamin D Behandlung nachgewiesen, während in der Placebo-Gruppe der IL-6 Gehalt sank. Die Ursache für die Unterschiede zu den Resultaten dieser Arbeit können durch die verschiedenen Untersuchungssysteme *in vitro* gegenüber *in vivo* bzw. PBMCs gegenüber T-Zellen begründet werden.

Für TNF- α konnte eine Verringerung des Sekretionsniveaus durch die Co-Stimulation mit Vitamin D gezeigt werden. Dies wird vor allem bei der Stimulation der PBMCs aus den MC-Patienten mit PGN für 6 h deutlich, da hier höhere Ausgangswerte der TNF- α Sekretion eine deutliche Divergenz aufzeigen. Die Vorinkubation mit Vitamin D reduzierte den TNF- α -Gehalt in den Überständen der Zellen aus den PBMCs der MC-Patienten. Besonders deutlich ist der Effekt bei der Induktion durch PGN. In den Gesundkontrollen waren eher geringe Effekte durch Vitamin D nachweisbar. Aufgrund der geringen Probenanzahl (n=3) sind Aussagen zur Signifikanz der Ergebnisse nicht möglich. Hier ist die Erhöhung der Probenzahl für die Interpretation der Ergebnisse unerlässlich.

Diese Ergebnisse korrelieren deutlich mit den Untersuchungen zur Genexpression von TNF- α und könnten somit die von uns postulierte, immunregulatorische Wirkung von Vitamin D zumindest auf das Zytokin TNF- α bestätigen.

Aus den erhobenen Daten der IFN- γ Sekretion lassen sich ähnliche Rückschlüsse ziehen. Aufgrund der gleichbleibend geringen IFN- γ Sekretion der PBMCs aus MC-Patienten, sowohl ohne

als auch mit Stimulation von LPS und PGN, lässt sich möglicherweise ein methodisches Problem vermuten. Andererseits wurde in den Kulturüberständen der PBMCs aus den Gesundkontrollen eine deutliche Reduktion der IFN- γ Sekretion durch die Vitamin D Behandlung festgestellt. Auch hier lässt sich eine anti-inflammatorische Wirkung von Vitamin D ableiten.

Anhand der obigen Ergebnisse zeigt sich eine hemmende Wirkung von Vitamin D auf die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Diese korreliert teilweise mit den Ergebnissen der RNA-Expression. Hierbei lässt sich der inhibierende Mechanismus wahrscheinlich auf die intranukleäre Wirkung von Vitamin D zurückführen. Dabei aktiviert Vitamin D das MAPK Phosphatase-1 (*MKP-1*) Gen, welches wiederum einen Effekt auf die pro-inflammatorische Kaskade der Zelle hat, was zur erniedrigten Sekretion von IL-6 und TNF- α führt (Zhang et al., 2012).

Aus den IL-10 ELISA Ergebnissen ist kein Einfluss einer Co-Stimulation mit Vitamin D ersichtlich. Aufgrund der durchgängigen Konstanz der Sekretionswerte, entschieden wir uns für die Überprüfung der gesammelten Daten mittels LEGENDplex Methodik. Die Ergebnisse ähnelten denen der Taqman Genexpressions-Experimente. Anders als bei den ELISA-Versuchen wurde mit dieser Methode kein IL-10 in den Überständen der Kontroll-PBMCs der MC-Patienten nachgewiesen. Erst durch die Stimulation mit LPS und PGN konnten geringe Mengen an IL-10 in den Überständen nachgewiesen werden. Die Vitamin D Co-Stimulation scheint bei den PBMCs aus beiden Gruppen bei den Stimulationen mit LPS und PGN eine leichte Reduzierung der IL-10 Sekretion zu bewirken. Diese eher widersprüchlich erscheinende Aussage zeigt die Komplexität der Übertragung eines *in vitro* Modells auf den lebenden Organismus. Um einen methodischen Fehler auszuschließen, müssen sich weitere Untersuchungen zur IL-10 Proteinexpression anschließen. Hierbei ist besonders auf die Überprüfung der Wirkung einer längeren Co-Stimulation der PBMCs mit Vitamin D zu achten.

4.3 *NOD2* Mutationen

In verschiedenen Studien wurde die Pathogenese von MC mit Mutationen von *NOD2* in Verbindung gebracht (Hugot et al., 2001, 2007; Ogura et al., 2001, Dumay et al., 2019). Die Mutationen R702W, G908R und 1007fs repräsentieren 32%, 18% und 31% der gesamten MC-Mutationen. Nachgewiesen wurden diese Mutationen bei 11% (R702W), 6% (G908R) bzw. 11% (1007fs) der MC-Patienten (Lesage et al., 2002). Deshalb wurden die Probanden (gesunde Kontrollen und MC-Patienten) auf das Vorkommen dieser drei Mutationen mittel Genotypisierung untersucht.

Diese Versuche wurden durchgeführt um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression pro- bzw. anti-inflammatorischer Zytokine in Abhängigkeit der *NOD2*-Mutationen bei PBMCs festzustellen. Es konnte unter den hier ausgewählten Bedingungen kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten für IL-1 β , IL-6 und IL-10 zwischen *NOD2*-Wildtyp und *NOD2*-Mutationsträgern gezeigt werden. Ein geringer, jedoch nicht signifikanter reduzierender Effekt der Vitamin D Vorbehandlung bei den MT könnte für die LPS-induzierte IL-6 Expression erkennbar sein (Abb. 17). Das könnte auf einen protektiven Effekt des Vitamin D hinweisen. Insgesamt ist bei diesen Untersuchungen die geringe Anzahl an Probanden als kritisch zu betrachten. Deshalb ist eine Validierung dieser Ergebnisse mit einer größeren Probandenzahl unumgänglich. Dabei wäre eine Zuordnung zu den entsprechenden Mutationen ein Ansatz für eine mögliche zukünftige personalisierte Therapie.

Weiterhin ist anzumerken, dass Lesage et al. (2002) isolierte Leukozyten für ihre Untersuchungen verwendeten. Möglicherweise könnte die Heterogenität der PBMCs auch eine Ursache dafür sein, dass in unseren Untersuchungen keine Unterschiede nachweisbar waren. Desweiteren bilden PBMCs ein leicht differentes Zellprofil ab als die Immunzellen der Darmmukosa.

4.4 Kritische Betrachtung

Die vielfältigen und zu Teilen auch divergierenden Ergebnisse dieser Arbeit müssen im Kontext des gewählten translationalen Ansatzes kritisch betrachtet werden. Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Individuen, lassen sich für viele der erkennbaren Tendenzen bezüglich des unterschiedlichen Verhaltens von PBMCs aus MC und HC, sowie auch des Einflusses von Vitamin D keine statistischen Signifikanzen ableiten. Hinzu kommt aufgrund der kleinen Kohortengröße eine gewisse Heterogenität der rekrutierten Morbus Crohn Patienten. Wie in Tab. 9 dargestellt, wurden sowohl PBMCs von Patienten in Remission als auch mit Krankheitsaktivität und unterschiedlicher Therapie untersucht. Dadurch lässt sich auch keine gesonderte Betrachtung von Patienten unter TNF- α Inhibition realisieren. Dies kann auch einen Einfluss auf das Reaktionsverhalten der verwendeten PBMCs Einfluss haben. So zeigten PBMCs aus Patienten unter Infliximab Therapie eine verringerte Proliferationsrate *in vitro* (Stio et al., 2004).

Zuletzt ist die Bedeutung des geringeren Durchschnittsalters der rekrutierten Kontrollgruppe im Verhältnis zu den untersuchten Morbus Crohn Patienten zu betrachten. Hierbei könnte vor allem das Entzündungsalter eine ergebnismodifizierende Wirkung haben. So konnte gezeigt werden, dass PBMCs aus jungen Erwachsenen (Alter 20 - 31 Jahre) im Vergleich zu PBMCs

aus Erwachsenen in mittlerem Alter (40 - 64 Jahre) *ex vivo* ein leicht differentes Zytokinprofil zeigen. Die untersuchten Probanden dieser Studie wiesen ebenfalls ein signifikant unterschiedliches Plasmalevel an TNF- α auf (Slusher et al., 2019).

Die Verwendung von PBMCs in einem translationalen Forschungsansatz hat sowohl Vor- als auch Nachteile. Aufgrund der schnellen Isolation von PBMCs aus Patientenblut, lässt es eine besonders flexible Probanden Rekrutierung zu. Im Gegenzug muss diskutiert werden, inwiefern die Ergebnisse der Zellkulturbedingungen auf die Verhältnisse im menschlichen Organismus projiziert werden können. So fehlen in dem etablierten *ex vivo* Modell, die natürlichen Stimuli, denen die zirkulierenden PBMCs im menschlichen Organismus ausgesetzt sind. Außerdem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass PBMCs nicht das gleiche Zellprofil wie mukosale Immunzellen des Gastrointestinaltraktes besitzen. So dominieren in PBMCs beispielsweise naive T-Zellen, während die T-Zellen der Lamina propria hauptsächlich einen CD44^{hi}CD62L⁻ Phentyp exprimieren und es sich somit um Zellen mit zurückliegendem Antigenkontakt handelt (Shale et al., 2013). Aufgrund der phenotypischen Unterschiede, sowie der unterschiedlichen Zelltypen in PBMCs und des mukosalen Immunsystems, scheint auch eine gewisse Differenz im Reaktionsmuster auf verschiedene Stimuli wahrscheinlich.

Trotzdessen konnte bereits in einigen Parallelstudien der prediktive Wert eines PBMC *in vitro* Modells gezeigt werden. So zum Beispiel anhand von Untersuchungen zum Einfluss von dietinduziertem Galectin-9 auf die Mastzelldegranulation im Rahmen von allergischen Reaktionen (de Kivit et al., 2012).

4.5 Ausblick

In den durchgeführten Arbeiten sollte die immunmodulierende Wirkung von Vitamin D gezeigt werden. Bekannt ist, dass Vitamin D neben der Funktion bei der Regulation des Calcium- und Phosphatstoffwechsels auch das angeborene und adaptive Immunsystem beeinflussen kann (DeLuca, 2004; Gombart et al., 2005; Liu et al., 2006). Seine Wirkung auf Immunzellen (T-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen) kann eine übermäßige Immunantwort verhindern (Hewison, 2012; Chambers und Hawrylowicz, 2011). Z.B. hemmt Vitamin D die Proliferation von T_H1- und T_H17-Zellen und damit die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (Cantorna et al., 2015). Zudem stärkt und erhält es die epitheliale Darmbarriere durch die Induktion der Expression von *tight junction* Proteinen und schützt damit vor Infektionen

und entzündlichen Schädigungen (Assa et al., 2015; Chen et al., 2015; Zhao et al., 2012). Beschrieben ist auch eine regulatorische Wirkung auf die Darmflora (Jin et al., 2015, Ooi et al., 2013; Schäffler et al., 2018c).

Die Ergebnisse dieser Arbeit mit *in vitro* Untersuchungen an PBMCs aus MC-Patienten und gesunden Kontrollen unterstützen zum Teil die protektive Wirkung von Vitamin D auf die Immunreaktion bei MC-Patienten. Es wurde gezeigt, dass eine Co-Stimulation mit Vitamin D die Basalexpression sowohl von IL-6 und TNF- α reduzierte. Für die IL-6 Expression könnte der Effekt der Vitamin D Behandlung bei Patienten mit Mutationen im *NOD2*-Gen sogar von Bedeutung sein. Hierbei handelt es sich jedoch um preliminäre Ergebnisse, welche es weiter zu untersuchen gilt. Im Falle von TNF- α wurde durch die Wirkung von Vitamin D die LPS- bzw. PGN induzierte TNF- α Expression verringert. Teilweise konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen jedoch keine Wirkung von Vitamin D auf die Reaktion der PBMCs nach diversen Stimulationen gezeigt werden. Hierbei muss die Komplexität des verwendeten Zell-Modells in Betracht gezogen werden. So spielt beispielsweise die Dauer der Stimulation mit Vitamin D für das Expressionsniveau von IL-10 eine entscheidende Rolle (Mätiläinen et al., 2010). Aufgrund dessen ist eine Weiterführung der etablierten Methodik mit einem modifizierten Stimulationsschema unabdinglich, um die bereits erbrachten Ergebnisse zu bestätigen und weiterhin offenstehende und nach wie vor interessante Fragestellungen zu beantworten. Dass dieses Thema auch weiterhin von wissenschaftlichem und klinischen Interesse ist, unterstützt eine Metaanalyse von 2018, die die entzündungshemmende Wirkung und den positiven Einfluss von Vitamin D und damit auch die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten mit CED beschreibt (Li et al., 2018). Die Autoren zeigen, dass die Gabe von Vitamin D in Abhängigkeit der Dosis den Vitamin D Spiegel der Patienten erhöhte. Aufgetretene milde Nebenwirkungen, wie Müdigkeit, Durst, Mundtrockenheit oder Übelkeit konnten nicht direkt mit der Vitamin D Gabe in Zusammenhang gebracht werden. Die Autoren hoben besonders hervor, dass die Gabe von Vitamin D die Rückfallrate reduzierte. Somit könnte Vitamin D als begleitende Therapie bei CED durchaus positive Effekte haben. Eine Individualisierung der Dosis für den Vitamin D-defizitären Patienten scheint zwar aufwändig, wäre schlussendlich aber ratsam.

5. Zusammenfassung

Aufgrund der steigenden Inzidenz in den Industrieländern und der weiterhin ungeklärten Pathogenese, stehen die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weiterhin im Fokus intensiver Forschung.

Ziel der Arbeit ist es zum einen, die NOD2-Rezeptor vermittelten Reaktionsmuster von gesunden Kontrollen mit denen von MC-Patienten zu vergleichen, sowie einen immunmodulatorischen Einfluss von Vitamin D zu überprüfen. Hierfür wurde eine Methode etabliert, bei der mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von gesunden Probanden (n=10) und von MC-Patienten (n=10) isoliert und anschließend mit verschiedenen Liganden des angeborenen Immunsystems (P3C, MDP, PGN und LPS) über definierte Zeiträume stimuliert wurden. Um einen möglichen Einfluss von Vitamin D zu untersuchen, wurde ein Teil der isolierten PBMCs zusätzlich mit Vitamin D für 20 h vorinkubiert. Anschließend wurden die pro- und anti-inflammatorischen Zytokinprofile analysiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten Anhaltspunkte für eine supportive Vitamin D Therapie bei MC-Patienten liefern.

Die PBMCs aus MC-Patienten zeigten nach Stimulation mit LPS, P3C und PGN eine signifikant höhere IL-1 β und IL-6 mRNA-Expression als die der gesunden Probanden. LPS (2 h) verursachte eine signifikant stärkere Erhöhung der TNF- α Genexpression bei den PBMCs aus MC. Dem gegenüber war die Induktion der IL-10 Genexpression durch die Wirkung von LPS (2 h) bzw. MDP bei den MC-PBMCs im Vergleich zu HC-PBMCs leicht geringer.

Eine Vitamin D Vorinkubation hemmt die IL-6 Expression der MC-PBMCs und verringerte so die Expressionsunterschiede für IL-6 zwischen HC und MC. Für IL-6 konnte eine signifikant verminderte Basalexpression in MC unter Vitamin D Einfluss nachgewiesen werden. Der Einfluss einer Vitamin D Vorinkubation reduzierte in HC die PGN-induzierte TNF- α Expression leicht. Bei den MC-PBMCs hingegen bewirkte Vitamin D eine signifikante Reduktion der LPS- bzw. PGN-induzierten TNF- α Expression, was auf einen stärkeren Effekt des Vitamin Ds auf die PBMCs aus MC hindeuten könnte. Die Vitamin D Vorinkubation hat einen hemmenden Effekt auf die IL-10 Genexpression in HC und auch MC-PBMCs.

Die Ergebnisse zur Proteinsekretion der Zytokine IL-6, TNF- α , IFN- γ und IL-10 spiegelten die Resultate der Genexpression teilweise nicht wider. So sezernierten die PBMCs der MC-Patienten signifikant weniger pro-inflammatorisches IL-6 als die der HC. Die Vorinkubation mit Vitamin D hatte weder bei HC noch MC einen Effekt auf die Proteinsekretion von IL-6.

Die Proteinsekretion des anti-inflammatorischen IL-10 wurden mittels LEGENDplex und Sandwich-ELISA Methodik untersucht. Hierbei wurde eine geringere IL-10 Sekretion in den Zellkulturüberständen der MC-Patienten im Vergleich zu den HC festgestellt. Die Vorbehandlung der Zellen mit Vitamin D war ohne Effekt.

Die TNF- α Ergebnisse ergaben eine Divergenz zwischen der Proteinsekretion aus HC und MC-Zellen. Beide reagieren auf eine Stimulation mit PGN, wobei eine deutlich stärkere Induktion der TNF- α Sekretion in den MC-Zellkulturen im Verhältnis zu den PBMCs aus HC nachgewiesen wurde. Vitamin D scheint diesen Effekt massgeblich bei den MC-PBMCs zu hemmen.

IFN- γ wird durch die PBMC aus den HC stärker sezerniert als durch die Zellen der MC, wobei durch die Wirkung der Liganden (LPS oder PGN) in beiden Zelltypen die Menge an IFN- γ nicht verändert wird. Die Vorbehandlung mit Vitamin D reduzierte die IFN- γ Sekretion bei den PBMCs aus den HC auf das Niveau der MC-Zellkulturen. Ein Einfluss von Vitamin D auf die IFN- γ Produktion der Zellen aus den MC konnte nicht nachgewiesen werden.

Für einen Einfluss einer *NOD2*-Mutation auf das Zytokinprofil der PBMCs konnte unter den gewählten Bedingungen keine Hinweise gefunden werden.

Aus den erbrachten Ergebnissen lassen sich mögliche Rückschlüsse auf die Beziehung zwischen inflammatorischen Prozessen von MC-Patienten und Gesunden, sowie der Wirkung von Vitamin D ableiten. So könnten die Ergebnisse der Untersuchungen zur pro-inflammatorischen Zytokinexpression auf eine erhöhte inflammatorische Reagibilität der PBMCs aus MC hindeuten. Auch zeigten sich Hinweise auf eine Hemmung der IL-6 und TNF- α Expression durch eine Vitamin D Co-Stimulation. Dies würde eine supportive Therapie mit Vitamin D unterstützen.

Dennoch ist eine Bewertung der teils widersprüchlichen Ergebnisse aufgrund der komplexen Datenlage und andauernden Forschung auf diesem Gebiet zum jetzigen Zeitpunkt noch schwierig. Auch müssen die Unterschiede bezüglich der Immunreaktion der verwendeten PBMCs im Vergleich zum mukosalen Immunsystem bedacht werden.

Diese Methode könnte mit den vorgeschlagenen Modifikationen für weitere Untersuchungen zur Erklärung der Mechanismen der supportiven Vitamin D Therapie genutzt werden. Auch lassen die gewonnenen Daten zum divergierenden Verhalten von PBMCs aus MC-Patienten und Gesundkontrollen Rückschlüsse auf die Pathologie von MC zu. Um die bereits gewonnen Ergebnisse weiter zu untermauern und zu überprüfen, sollten die Untersuchungen in einer größeren Kohorte fortgeführt werden. Zudem könnten durch weitere Subgruppierungen Aussagen

zur Rolle des *NOD2*-Mutationsstatus, des Alters der Probanden und zum Einfluss einer immunsuppressiven Therapie auf die immunologischen Prozesse in MC getroffen werden.

6. Thesen

1. Bei Morbus Crohn handelt es sich um eine chronisch entzündliche Darmerkrankung mit noch nicht vollständig geklärter Pathologie. Sie beruht wahrscheinlich auf einer Barriere-störung mit konsekutiver Dysregulation des mukosalen Immunsystems.
2. Verschiedene Studien legen einen Zusammenhang der Ätiopathogenese und einem Vitamin D Mangel nahe. Ein Vitamin D Mangel bei Morbus Crohn Patienten ist hochprävalent.
3. Vor allem im Hinblick auf einen supportiven Therapieansatz ist eine genauere Betrachtung der immunmodulierenden Wirkung von Vitamin D interessant.
4. Die Arbeit mit PBMCs im Rahmen von chronisch entzündlichen Erkrankungen ist eine etablierte Methode des translationalen Forschungsansatzes, besonders im Bereich der personalisierten Medizin.
5. PBMCs aus Morbus Crohn Patienten zeigen eine signifikant stärkere IL-1 β und IL-6, sowie TNF- α Expressionssteigerung nach Stimulation mit LPS, P3C, oder PGN als PBMCs aus HC.
6. Eine Stimulation mit NOD2 Liganden bzw. LPS bewirkt eine geringer ausgeprägte IL-10 Expressionssteigerung in MC-PBMCs als bei PBMCs aus HC.
7. PBMCs aus MC zeigen eine geringere IL-6 Proteinsekretion als HC-PBMCs
8. PBMCs aus MC-Patienten zeigen eine stark erhöhte TNF- α Sekretion nach PGN Stimulation.
9. Vitamin D Co-Stimulation senkt die IL-6 Basalexpression in HC und MC und gleicht die IL-6 und TNF- α Expressionsniveaus aus MC-PBMCs an das von HC-PBMCs an.

10. Vitamin D hemmt die IL-10 Basalexpression in PBMCs aus HC und MC, sowie nach Stimulation mit LPS.
11. Die Vitamin D Co-Stimulation hemmt eine PGN induzierte TNF- α Sekretionserhöhung in MC PBMCs.
12. Ein NOD2 Mutationsstatus hat im gewählten Modell keinen Einfluss auf das Zytokinprofil.
13. Die verstärkte IL-1 β , IL-6 und TNF- α Expression der MC-PBMCs gegenüber der HC-PBMCs könnte ein Zeichen für die dysregulierte Immunreaktion bei Morbus Crohn Patienten darstellen.
14. Vitamin D zeigte sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene einen hemmenden Effekt auf das pro-inflammatorische Zytokinprofil von PBMCs. Dies spricht für eine supportive Therapie von MC Patienten mittels Vitamin D.
15. Aufgrund der geringen untersuchten Kohortengröße ist eine Validierung der Ergebnisse mit einer größeren Probandenzahl und einer homogeneren Patientenkohorte unumgänglich.

7. Literaturverzeichnis

1. Abhimanyu, Coussens AK. The role of UV radiation and vitamin D in the seasonality and outcomes of infectious disease. *Photochem Photobiol Sci.* 2017;16:314-338.
2. Alhagamhmad MH, Day AS, Lemberg DA, Leach ST. An overview of the bacterial contribution to Crohn disease pathogenesis. *J Med Microbiol.* 2016;65:1049-1059.
3. Al Mutair AN, Nasrat GH, Russell DW. Mutation of the CYP2R1 vitamin D 25-hydroxylase in a Saudi Arabian family with severe vitamin D deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 ;97:E2022-2025
4. Alrefai D, Jones J, El-Matary W, Whiting SJ, Aljebreen A, Mirhosseini N, Vatanparast H. The Association of Vitamin D Status with Disease Activity in a Cohort of Crohn's Disease Patients in Canada. *Nutrients.* 2017;9. pii: E1112. doi: 10.3390/nu9101112
5. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Higuchi LM, Bao Y, Korzenik JR, Giovannucci EL, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT. Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2012;142:482-9
6. Assa A, Vong L, Pinnell LJ, Rautava J, Avitzur N, Johnson-Henry KC, Sherman PM. Vitamin D deficiency predisposes to adherent-invasive *Escherichia coli*-induced barrier dysfunction and experimental colonic injury. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21:297-306
7. Aufses AH Jr. The history of surgery for Crohn's disease at The Mount Sinai Hospital. *Mt-Sinai-J-Med.* 2000;67:198-203
8. Barbalho SM, Goulart RA, Gasparini RG. Associations between inflammatory bowel diseases and vitamin D. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;13:1-10.
9. Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13:5571-6.
10. Baumgart DC. Diagnostik und Therapie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. *Deutsches Ärzteblatt.* 2009;106:123-133
11. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet.* 2012;380:1590-605
12. Bendix-Struve M, Bartels LE, Agnholt J, Dige A, Jørgensen SP, Dahlerup JF. Vitamin D3 treatment of Crohn's disease patients increases stimulated T cell IL-6 production and proliferation. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;32:1364-72.
13. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Wajda A. Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am-J-Epidemiol.* 1999;149: 916-924
14. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology.* 1976;70:439-444

15. Beynon V, Cotofana S, Brand S, Lohse P, Mair A, Wagner S, Mussack T, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Folwaczny C, Glas J, Török HP. NOD2/CARD15 genotype influences MDP-induced cytokine release and basal IL-12p40 levels in primary isolated peripheral blood monocytes. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:1033-40
16. Bland R, Zehnder D, Hewison M. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 [alpha]-hydroxylase along the nephron: new insights into renal vitamin D metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertension*. 2000;9:17–22.
17. Blaschke M, Koepp R, Cortis J, Komrakova M, Schieker M, Hempel U, Siggelkow H. IL-6, IL-1 β , and TNF- α only in combination influence the osteoporotic phenotype in Crohn's patients via bone formation and bone resorption. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27:45-56
18. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-36.
19. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nuñez G. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*. 2003b;124:140-146
20. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 2009;58:1152-67
21. Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:2058-69
22. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:1717S-20S
23. Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)2D regulation of T cells. *Nutrients*. 2015;7:3011-21
24. Caviezel D, Maissen S, Niess JH, Kiss C, Hruz P. High Prevalence of Vitamin D Deficiency among Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Intest Dis*. 2018;2:200-210.
25. Chambers ES, Hawrylowicz CM. The impact of Vitamin D on regulatory T cells. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011;11:29-36
26. Chen ML, Sundrud MS Cytokine Networks and T-Cell Subsets in Inflammatory Bowel Diseases *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22:1157-67.
27. Chen SW, Wang PY, Zhu J, Chen GW, Zhang JL, Chen ZY, Zuo S, Liu YC, Pan YS. Protective effect of 1,25-dihydroxyvitamin d3 on lipopolysaccharide-induced intestinal epithelial tight junction injury in caco-2 cell monolayers. *Inflammation*. 2015;38:375-83

28. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:7711-7715.
29. Cheraghi N, Dai H, Raghuveer G (2012). Vitamin D deficiency is associated with atherosclerosis-promoting risk factor clustering but not vascular damage in children. *Med. Sci. Monit.* 18, CR687–CR692.
30. Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X, Porta A. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem*. 2003;88:695-705
31. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, Schreiber S, Byczkowski D, Li J, Kent JD, Pollack PF. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology*. 2007;132:52-65.
32. Colston K, Colston M.J, Feldman D, 1,25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology*, 1981, 108, 1083-1086.
33. Correa I, Veny M, Esteller M, Piqué JM, Yagüe J, Panés J, Salas A. Defective IL-10 production in severe phenotypes of Crohn's disease. *Leukoc Biol*. 2009;85:896-903.
34. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis; a pathological and clinical entity. *JAMA* 1932;99:1323–1329.
35. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer. *JAMA*. 1984;251:73-79
36. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: pathological and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med*. 2000; 67: 263-268.
37. Dadaei T, Safapoor MH, Asadzadeh Aghdaei H, Balaii H, Pourhoseingholi MA, Naderi N, Zojaji H, Azimzadeh P, Mohammadi P, Zali MR. Effect of vitamin D3 supplementation on TNF- α serum level and disease activity index in Iranian IBD patients. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2015;8:49-55.
38. Deepak P, Sandborn WJ. Ustekinumab and Anti-Interleukin-23 Agents in Crohn's Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017;46:603-626
39. Degenhardt F, Franke A. Genetik des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa Aktueller Stand 15 Jahre nach Entdeckung von *NOD2*. *Der Gastroenterologe* 2017;12:38–48
40. Del Gaudio A; Panettiere P; Marchetti L; Accorsi D; Fuzzi N; The impact of genetics on Crohn's disease. *Hepatogastroenterology*. 1999;46:784-789.
41. de Kivit S, Saeland E, Kraneveld AD, van de Kant HJG, Schouten B, van Esch BCAM, Knol J, Sprickelman AB, van der Aa LB, Knippels LMJ, Garssen J, van Kooyk Y, Wil-

- lemsen LEM. Galectin-9 induced by dietary synbiotics is involved in suppression of allergic symptoms in mice and humans. *Allergy* 2012; Doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02771.x
42. DeLuca HF. Vitamin D: the vitamin and the hormone. *Federation Proceedings*. 1974;33:2211–2219
43. DeLuca HF, Krisinger J, Darwish H. The vitamin D system: 1990. *Anal Biochem*. 1990;190:102-7
44. DeLuca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep*. 2014;3:article number 479
45. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of Vitamin D. *Am J. of Clin Nutr*. 2004; 80:1689S-96S
46. DGE Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. (2012). Wie viel Vitamin D brauchen wir. DGE Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. <http://www.dge.de/presse/pm/wie-viel-vitamin-d-brauchen-wir/>, Stand 16.02.1
47. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13:13-27
48. Dias de Castro F, Magalhães J, Boal Carvalho P, Moreira MJ, Mota P, Cotter J. Lower levels of vitamin D correlate with clinical disease activity and quality of life in inflammatory bowel disease. *Arq Gastroenterol*. 2015;52:260-265
49. Dickson, I. Crohn's disease: impaired bacterial clearance in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13, 251.
50. Dionne S, Duchatelier CF, Seidman EG. The influence of vitamin D on M1 and M2 macrophages in patients with Crohn's disease. *Innate Immun*. 2017;23:557-565
51. Dumay A, Gergaud O, Roy M, Hugot JP. Is Crohn Disease the price to pay today for having survived to the Black Death? *J Crohns Colitis*. 2019 Mar 20. pii: jjz062. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz062.
52. Durum SK, Schmidt JA, Oppenheim JJ. Interleukin 1: an immunological perspective. *Annu Rev Immunol*. 1985;3:263-287.
53. Ebeling PR, Adler RA, Jones G, Liberman UA, Mazziotti G, Minisola S, Munns CF, Napoli N, Pittas AG, Giustina A, Bilezikian JP, Rizzoli R. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Therapeutics of Vitamin D. *Eur J Endocrinol*. 2018;179:R239-R259.
54. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:2393–404.
55. Esvelt RP, Schnoes HK, DeLuca HF. Vitamin D₃ from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light. *Arch Biochem Biophys*. 1978;188:282-286.

56. Farmer RG, Hawk GA, Turnbull RB Jr. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* 1975;68:627-635
57. Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel JF, Sandborn WJ, van Assche G, Axler J, Kim HJ, Danese S, Fox, Milch C, Sankoh S, Wyant T, Xu J, Parikh A. GEM-INI 1 Study Group. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med*. 2013;369:699–710.
58. Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, Blank MA, Johans J, Gao LL, Miao Y, Adedokun OJ, Sands BE, Hanauer SB, Vermeire S, Targan S, Ghosh S, de Villiers WJ, Colombel JF, Tulassay Z, Seidler U, Salzberg BA, Desreumaux P, Lee SD, Loftus EV Jr, Dieleman LA, Katz S, Rutgeerts P; UNITI-IM-UNITI Study Group. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med*. 2016;375:1946-1960
59. Fischer S, Rath T, Neurath MF. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. *Internist*. 2018;59:681-693
60. Frigstad SO, Høivik M, Jahnsen J, Dahl SR, Cvancarova M, Grimstad T, Berset IP, Hupertz-Hauss G, Hovde Ø, Torp R, Bernklev T, Moum B, Jelsness-Jørgensen LP. Vitamin D deficiency in inflammatory bowel disease: prevalence and predictors in a Norwegian outpatient population. *Scand J Gastroenterol*. 2017;52:100-106.
61. Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res*. 2015;2015:489821.
62. Fu GK, Lin D, Zhang MY, Bikle DD, Shackleton CH, Miller WL, Portale AA. Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol Endocrinol*. 1997;11:1961-1970.
63. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Dis Mon*. 2018;64:20-57
64. Garg M, Lubel JS, Sparrow MP, Holt SG, Gibson PR. Review article: vitamin D and inflammatory bowel disease--established concepts and future directions. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;36:324-344.
65. Garg M, Hendy P, Ding JN, Shaw S, Hold G, Hart A. The Effect of Vitamin D on Intestinal Inflammation and Faecal Microbiota in Patients with Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis*. 2018;12:963-972.
66. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003;278:8869-72.
67. Glocker EO, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1246:102-7.

68. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J.* 2005;19:1067-77
69. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, Peyrin-Biroulet L, Cullen GJ, Daperno M, Kucharzik T, Rieder F, Almer S, Armuzzi A, Harbord M, Langhorst J, Sans M, Chowers Y, Fiorino G, Juillerat P, Mantzaris GJ, Rizzello F, Vavricka S, Gionchetti P; ECCO. 3rd European evidence- based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: part 1: diagnosis and medical management. *J Crohns Colitis* 2017;11:3–25
70. Guan Q, Zhang J. Recent Advances: The Imbalance of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm.* 2017;4810258. doi: 10.1155/2017/4810258
71. Gubatan J, Moss AC. Vitamin D in inflammatory bowel disease: more than just a supplement. *Curr Opin Gastroenterol.* 2018;34:217-225.
72. Gutierrez O, Pipaon c, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F (2002): Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (44), S. 41701–41705.
73. Guillot X, Prati C, Wendling D, Saidenberg-Kermanac'h N, Semerano L, Falgarone G, Boissier MC. Inflammation and vitamin D. in *Handbook of vitamin D in human health: Prevention, treatment and toxicity.* Watson RR, editor. The Netherlands, Wageningen Academic Publishers. 2013:372-390
74. Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest.* 1993;91:2552-2555
75. Hanauer SB, Feagen BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P; ACCENT I Study Group. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet.* 2002;359:1541-9.
76. Hansen T, Duerksen DR. Enteral Nutrition in the Managment of Pediatric and Adult Crohn's Disease. *Nutrients.* 2018;10. pii: E537. doi: 10.3390/nu10050537. PMID 29701656
77. *Harrisons Innere Medizin.* Herausgeber Norbert Suttorp, Martin Möckel, Britta Siegmund, Manfred Dietel. ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft.
78. He L, Liu T, Shi Y, Tian F, Hu H, Deb DK, Chen Y, Bissonnette M, Li YC. Gut Epithelial Vitamin D Receptor Regulates Microbiota-Dependent Mucosal Inflammation by Suppressing Intestinal Epithelial Cell Apoptosis. *Endocrinology.* 2018;159:967-979
79. Hewison M. Vitamin D and immune function: an overview. *Proc Nutr Soc.* 2012;71:50-61

80. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124:993-1000.
81. Hoffmann JC, Preiß JC, Autschbach F, Buhr HJ, Hauser W, Herrlinger K, Höhne W, Koletzko S, Krieglstein CF, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G, Schreiber S, Schreyer AG, Sido B, Siegmund B, Stallmach A, Bokemeyer B, Stange EF, Zeitz M. S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“. *Z Gastroenterol* 2008;46:1094–146.
82. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT Jr, Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science*. 1980;210:203-205.
83. Holick FM. The Cutaneous Photosynthesis of Previtamin D3: A Unique Photoendocrine System. *J Invest Dermatol*. 1981;77: 51-58
84. Holick MF. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 1995;61:638-645
85. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1678S-88S
86. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*. 2006;81:353-373.
87. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007a;357:266-81
88. Holick MF. Optimal vitamin D status for the prevention and treatment of osteoporosis. *Drugs Aging*. 2007b;24:1017-29.
89. Hollis BW. Assessment of vitamin D nutritional and hormonal status: what to measure and how to do it. *Calcif Tissue Int*. 1996;58:4-5
90. Hollis BW and Wagner CL. The Role of the Parent Compound Vitamin D with Respect to Metabolism and Function: Why Clinical Dose Intervals Can Affect Clinical Outcomes *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:4619-4628
91. Hossein-nezhad A, Holick MF. Optimize dietary intake of vitamin D: an epigenetic perspective. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15:567-79
92. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc*. 2013;88:720-55
93. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:563-73
94. Hruz, P., Zinkernagel, A. S., Jenikova, G., Botwin, G. J., Hugot, J. P., Karin, M., Nizet, V. & Eckmann, L. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus*

- through a-toxin-dependent innate immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12873–12878.
95. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:599–603. doi:10.1038/35079107
 96. Hugot JP, Zaccaria I, Cavanaugh J, Yang H, Vermeire S, Lappalainen M, Schreiber S, Annese V, Jewell DP, Fowler EV, Brant SR, Silverberg MS, Cho J, Rioux JD, Satsangi J, Parkes M; IBD International Genetics Consortium. Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:1259-1267
 97. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nuñez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem*. 2001;276:4812-8
 98. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat.Rev.Immunol*. 2003;3:371-82.
 99. Ince MN, Elliott DE. Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. *Surg Clin North Am*. 2007;87:681-96
 100. IOM Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, The National Academic Press, Washington, D.C. 2011
 101. Ito H. Anti-interleukin-6 therapy for Crohn's disease. *Curr Pharm Des*. 2003;9:295-305
 102. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, Matsumoto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N, Yoshizaki K, Shimoyama T, Kishimoto T. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;126:989-96
 103. Jäger S, Stange EF, Wehkamp J. Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch Surg*. 2013;398:1–12
 104. Jantchou P, Clavel-Chapelon F, Racine A, Kvaskoff M, Carbonnel F, Boutron-Ruault MC. High residential sun exposure is associated with a low risk of incident Crohn's disease in the prospective E3N cohort, *Inflamm. Bowel Dis*. 2014;20:75–81.
 105. Jin D, Wu S, Zhang YG, Lu R, Xia Y, Dong H, Sun J. Lack of Vitamin D Receptor Causes Dysbiosis and Changes the Functions of the Murine Intestinal Microbiome. *Clin Ther*. 2013;37:996-1009
 106. Jørgensen SP, Agnholt J, Glerup H, Lyhne S, Villadsen GE, Hvas CL, Bartels LE, Kelsen J, Christensen LA, Dahlerup JF. Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32:377-83
 107. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012; 491:119–24. doi:10.1038/nature11582

108. Kabbani TA, Koutroubakis IE, Schoen RE, Ramos-Rivers C, Shah N, Swoger J, Regueiro M, Barrie A, Schwartz M, Hashash JG, Baidoo L, Dunn MA, Binion DG Association of Vitamin D Level With Clinical Status in Inflammatory Bowel Disease: A 5-Year Longitudinal Study. *Am J Gastroenterol*. 2016;111:712-9.
109. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12:720-727
110. Kelly P, Suibhne TN, O'Morain C, O'Sullivan M. Vitamin D status and cytokine levels in patients with Crohn's disease. *Int J Vitam Nutr Res*. 2011;81:205-10
111. Khalili H, Huang ES, Ananthakrishnan AN, Higuchi L, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT, Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women, *Gut* 2012;61:1686–1692.
112. Khoo AL, Chai LY, Koenen HJ, Sweep FC, Joosten I, Netea MG, van der Ven AJ. Regulation of cytokine responses by seasonality of vitamin D status in healthy individuals. *Clin Exp Immunol*. 2011;164:72-79
113. Kleiveland C.R. (2015) Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K. et al. (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer, Cham
114. Ko KH, Kim YS, Lee BK, Choi JH, Woo YM, Kim JY, Moon JS Vitamin D deficiency is associated with disease activity in patients with Crohn's disease. *Intest Res*. 2018;17:70-77
115. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005; 307:731-4
116. Korzenik JR, Podolsky DK. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:197-209.
117. Kucharzik T, Stoll R, Lügering N, Domschke W. Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*. 1995;100:452-6
118. Kucharzik T, Lügering N, Adolf M, Domschke W, Stoll R. Synergistic effect of immunoregulatory cytokines on peripheral blood monocytes from patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1997;42:805-12.
119. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nuñez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*. 2003; 125:47–57.
120. Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 2002;70:845-57

121. Li J, Chen N, Wang D, Zhang J, Gong X. Efficacy of vitamin D in treatment of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Medicine*. 2018;97:e12662
122. Li X, Stark GR. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp.Hematol*. 2002; 30:285-96.
123. Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewitz D. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. *Gut*. 1990;31:686-689
124. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006 ;311:1770-1773
125. Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ 3rd, Sandborn WJ. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:254-61.
126. Lowry MB, Guo C, Borregaard N, Gombart AF. Regulation of the human cathelicidin antimicrobial peptide gene by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in primary immune cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014 Sep;143:183-91
127. Marlow GJ, van Gent D, Ferguson LR. Why interleukin-10 supplementation supplementation does not work in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol*. 2013;19:3931-41
128. Martinez-Medina M, Denizot J, Dreux N, Robin F, Billard E, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A, Barnich N. Western diet induces dysbiosis with increased E coli in CEA-BAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut*. 2014;63:116-24
129. Martin NG, Rigterink T, Adamji M, Wall CL, Day AS. Single high-dose oral vitamin D₃ treatment in New Zealand children with inflammatory bowel disease. *Transl Pediatr*. 2019;8:35-41.
130. Martini GA. History of chronic inflammatory bowel diseases (ulcerative colitis and Crohn disease). *Internist-Berl*. 1991;32: 505-510
131. Matilainen JM, Husso T, Toropainen S, Seuter S, Turunen MP, Gynther P, Ylä-Herttuala S, Carlberg C, Väisänen S. Primary effect of 1 α ,25(OH)₂D₃ on IL-10 expression in monocytes is short-term down-regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803:1276-86
132. Mechie NC, Mavropoulou E, Ellenrieder V, Petzold G, Kunsch S, Neesse A, Amanzada A. Serum vitamin D but not zinc levels are associated with different disease activity status in patients with inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98:e15172. doi: 10.1097/MD.00000000000015172.
133. Mitsuyama K, Tomiyasu N, Takaki K, Masuda J, Yamasaki H, Kuwaki K, Takeda T, Kitazaki S, Tsuruta O, Sata M. Interleukin-10 in the pathophysiology of inflammatory

- bowel disease: increased serum concentrations during the recovery phase. *Mediators Inflamm.* 2006;2006:26875
134. Mohanan V, Grimes CL. The molecular chaperone HSP70 binds to and stabilizes NOD2, an important protein involved in Crohn disease. *J Biol Chem.* 2014;289:18987-98
135. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 2012;142:46-54.
136. Müller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, Bendtzen K. 1,25- Dihydroxyvitamin D3 inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. *Cytokine.* 1992;4:506-512
137. Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:968-84
138. Narula N, Cooray M, Anglin R, Muqtadir Z, Narula A, Marshall JK. Impact of High-Dose Vitamin D3 Supplementation in Patients with Crohn's Disease in Remission: A Pilot Randomized Double-Blind Controlled Study. *Dig Dis Sci.* 2017;62:448-455.
139. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:329-42.
140. Nielsen OH, Køppen T, Rüdiger N, Horn T, Eriksen J, Kirman I. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1996;41:1786–1793.
141. Nielsen OH, Hansen TI, Gubatan JM, Jensen KB, Rejnmark L. Managing vitamin D deficiency in inflammatory bowel disease. *Frontline Gastroenterology* 2019;0;1-7
142. Nishimoto N and Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2:619-26
143. Nunberg MY, Werner L, Kopylov U, Haberman Y, Lahad A, Weiss B, Shouval DS. Impaired IL-10 Receptor-mediated Suppression in Monocyte From Patients With Crohn Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;66:779-784
144. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411:603–6.10.1038/35079114
145. Olesen CM, Coskun M, Peyrin-Biroulet L, Nielsen OH. Mechanisms behind efficacy of tumor necrosis factor inhibitors in inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Ther.* 2016;159:110-9.
146. Olliver M, Spelmink L, Hiew J, Meyer-Hoffert U, Henriques-Normark B, Bergman P. Immunomodulatory effects of vitamin D on innate and adaptive immune responses to *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 2013;208:1474-81
147. O'Neill LA. How NOD-ing off leads to Crohn disease. *Nat Immunol.* 2004;5:776-8.

148. Ooi JH, Li Y, Rogers CJ, Cantorna MT. Vitamin D regulates the gut microbiome and protects mice from dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Nutr.* 2013;143:1679-86
149. Ott C, Obermeier F, Thielert S et al. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 917–923
150. Peake ST, Bernardo D, Mann ER, Al-Hassi HO, Knight SC, Hart AL. Mechanisms of action of anti-tumor necrosis factor α agents in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:1546-55
151. Petnicki-Ocwieja T, Hrnčir T, Liu YJ, Biswas A, Hudcovic T, Tlaskalova-Hogenova H, Kobayashi KS. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep;106:15813-8.
152. Pike JW, Christakos S. Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2017;46:815-843.
153. Pike JW, Meyer MB. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012;38:13-27
154. Preiß JC, Bokemeyer B, Buhr HJ, Dignaß A, W. Häuser AW, Hartmann F, Herrlinger KR, Kaltz B, Kienle P, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Schreiber S, Siegmund B, Stallmach A, Stange EF, Stein J, Hoffmann JC. Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des M. Crohn“ 2014. AWMF-Registriernummer: 021-004
155. Till A, Rosenstiel P, Brautigam K, Sina C, Jacobs G, Oberg HH, Seegert D, Chakraborty T, Schreiber S. A role for membrane-bound CD147 in NOD2-mediated recognition of bacterial cytoinvasion. *J Cell Sci.* 2008;121:487-95.
156. Timmer A. Epidemiologie der CED. In: Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B Hrsg Chronisch entzündliche Darmerkrankungen – Handbuch für die Praxis. 2. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2009: 8–24
157. Raftery T, O'Sullivan M. Optimal vitamin D levels in Crohn's disease: a review. *Proc Nutr Soc.* 2015a;74:56-66
158. Raftery T, Merrick M, Healy M, Mahmud N, O'Morain C, Smith S, McNamara D, O'Sullivan M. Vitamin D Status Is Associated with Intestinal Inflammation as Measured by Fecal Calprotectin in Crohn's Disease in Clinical Remission. *Dig Dis Sci.* 2015b;60:2427-35
159. Raftery T, Martineau AR, Greiller CL, Ghosh S, McNamara D, Bennett K, Meddings J, O'Sullivan M. Effects of vitamin D supplementation on intestinal permeability, cathelicidin and disease markers in Crohn's disease: Results from a randomised double-blind placebo-controlled study. *United European Gastroenterol J.* 2015c;3:294-302

160. Rehman A, Sina C, Gavrilova O, Häsler R, Ott S, Baines JF, Schreiber S, Rosenstiel P. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut*. 2011;60:1354-62.
161. Reich KM, Fedorak RN, Madsen K, Kroeker KI. Vitamin D improves inflammatory bowel disease outcomes: basic science and clinical review. *World J Gastroenterol*. 2014 ;20:4934-47
162. Reich KM, Fedorak RN, Madsen K, Kroeker KI. Role of Vitamin D in Infliximab-induced Remission in Adult Patients with Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22:92-9.
163. Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, *IL-6*, and *IL-1* beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*. 1993;94:174-181.
164. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S (2003): TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. In: *Gastroenterology* 124 (4), S. 1001-1009.
165. Roses RE, Rombeau JL. Recent trends in the surgical management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14:408-412
166. Saleh M, Trinchieri G. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:9-20
167. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel J-F, Sands BE, Lukas M, Fedorak RN, Lee S, Bressler B, Fox I, Rosario M, Sankoh S, Xu J, Stephens K, Milch C, Parikh. A Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. GEM-INI 2 Study Group. *N Engl J Med*. 2013;369:711-721
168. Sandborn WJ, van Assche G, Reinisch W, Colombel JF, D'Haens G, Wolf DC, Kron M, Tighe MB, Lazar A, Thakkar RB. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2012 ;142:257-65.
169. Santos-Antunes J, Nunes AC, Lopes S, Macedo G. The Relevance of Vitamin D and Antinuclear Antibodies in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Anti-TNF Treatment: A Prospective Study. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22:1101-6
170. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3:390-407.
171. Satokari R. Contentious host-microbiota relationship in inflammatory bowel disease--can foes become friends again? *Scand J Gastroenterol*. 2015;50:34-42
172. Satsangi J, Wolstencroft RA, Cason J, Ainley CC, Dumonde DC, Thompson RP. Interleukin 1 in Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*. 1987;67:594-605

173. Saxena M, Yeretssian G. NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Front Immunol.* 2014 Jul 14;5:327
174. Schäffler H, Demircioglu DD, Kühner D, Menz S, Bender A, Autenrieth IB, Bodammer P, Lamprecht G, Götz F, Frick JS. NOD2 stimulation by *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan is boosted by Toll-like receptor 2 costimulation with lipoproteins in dendritic cells. *Infect Immun.* 2014;82:4681-8
175. Schäffler H, Herlemann DP, Alberts C, Kaschitzki A, Bodammer P, Bannert K, Köller T, Warnke P, Kreikemeyer B, Lamprecht G. Mucosa-attached bacterial community in Crohn's Disease coheres with the Clinical Disease Activity Index. *Environ Microbiol Rep.* 2016a;8:614-621
176. Schäffler H, Kaschitzki A, Alberts C, Bodammer P, Bannert K, Köller T, Warnke P, Kreikemeyer B, Lamprecht G. Alterations in the mucosa-associated bacterial composition in Crohn's disease: a pilot study. *Int J Colorectal Dis.* 2016b;31:961-71
177. Schäffler H, Schmidt M, Huth A, Reiner J, Glass Ä, Lamprecht G. Clinical factors are associated with vitamin D levels in IBD patients: A retrospective analysis. *J Dig Dis.* 2018a;19:24-32
178. Schäffler H, Rohde M, Rohde S, Huth A, Gittel N, Hollborn H, Koczan D, Glass Ä, Lamprecht G, Jaster R. *NOD2*- and disease-specific gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells from Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol.* 2018b;24:1196-1205
179. Schäffler H, Herlemann DP, Klinitzke P, Berlin P, Kreikemeyer B, Jaster R, Lamprecht G. Vitamin D administration leads to a shift of the intestinal bacterial composition in Crohn's disease patients, but not in healthy controls. *J Dig Dis.* 2018c;19:225-234
180. Schäffler H, Geiss D, Gittel N, Rohde S, Huth A, Glass Ä, Brandhorst G, Jaster R, Lamprecht G. Mutations in the *NOD2* gene are associated with a specific phenotype and lower anti-tumor necrosis factor trough levels in Crohn's disease. *J Dig Dis.* 2018d ;19:678-684.
181. Schreiber S, Khaliq-Kareemi M, Lawrance IC, Thomsen OØ, Hanauer SB, McColm J, Bloomfield R, Sandborn WJ; PRECISE 2 Study Investigators. Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):239-50.
182. Schwarzmaier D, Foell D, Weinlage T, Varga G, Däbritz J. Peripheral monocyte functions and activation in patients with quiescent Crohn's disease. *PloS One.* 2013;26;8:e62761
183. Segal AW. Studies on patients establish Crohn's disease as a manifestation of impaired innate immunity. *J Intern Med.* 2019;May 28. doi: 10.1111/joim.12945.
184. Shale M, Schiering C, Powrie F. CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunol Rev.* 2013;252:164–182. doi:10.1111/imr.12039
185. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010;6:468–476.

186. Shouval DS, Rufo PA. The Role of Environmental Factors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases: A Review. *JAMA Pediatr.* 2017;171:999-1005.
187. Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwitz BH, Klein C, Muise AM, Snapper SB. Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. *Adv Immunol.* 2014;122:177-210
188. Shivananda S, Lennard-Jones JE, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe; Is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-697
189. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus EV Jr, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warran BF. Toward an integrated clinical , molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol.* 2005;19 Suppl A:5A-36A
190. Slusher AL, Zúñiga TM, Acevedo EO. *Inflamm-Aging* Is Associated with Lower Plasma PTX3 Concentrations and an Impaired Capacity of PBMCs to Express hTERT following LPS Stimulation. *Mediators Inflamm.* 2019;2324193. doi: 10.1155/2019/2324193
191. Smith JE, Goodman DS. The turnover and transport of vitamin D and of a polar metabolite with the properties of 25-hydroxycholecalciferol in human plasma. *J Clin Invest.* 1971;50:2159–2167
192. Smith AM, Rahman FZ, Hayee B, Graham SJ, Marks DJ, Sewell GW, Palmer CD, Wilde J, Foxwell BM, Gloger IS, Sweeting T, Marsh M, Walker AP, Bloom SL, Segal AW. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med.* 2009;206:1883-97
193. Stange EF, Schmid M, Fellermann K, Wehkamp J. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED): Neue pathophysiologische Erkenntnisse – Folgerungen für die Klinik. *Praxis.* 2005;94:1429-1432
194. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinskis L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF, Gasche C, Tilg H, Schreiber SW, Schölmerich J, Reinisch W. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006; 55 Suppl 1: i1-i15
195. Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, Antonioli D, Peppercorn MA, Strom TB. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1992;37:818–826.
196. Stio M, Retico L, Annese V, Bonanomi AG. Vitamin D regulates the tight-junction protein expression in active ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2016;51:1193-9

197. Stio M, Treves C, Martinesi M, d'Albasio G, Bagnoli S, Bonanomi AG. Effect of anti-TNF therapy and vitamin D derivatives on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells in Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 2004;49:328-335.
198. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:9-20.
199. Summerday N M, Brown SJ, Allington DR, Rivey MP (2012). Vitamin D and multiple sclerosis: review of a possible association. *J. Pharm. Pract.* 25, 75–84.
200. Sutton ALM, MacDonald PN. Vitamin D: More Than a “Bone-a-Fide” Hormone. *Molecular Endocrinology.* 2003;17:777-791
201. Tan B, Li P, Lv H, Yang H, Li Y, Li J, Wang O, Qian JM. Treatment of vitamin D deficiency in Chinese inflammatory bowel disease patients: A prospective, randomized, open-label, pilot study. *J Dig Dis.* 2018;19:215-224.
202. Verschoor CP, Wallace JG, Johnstone J, Loeb M, Bramson JL, Bowdish DM. Circulating muramyl dipeptide is negatively associated with interleukin-10 in the frail elderly. *Inflammation.* 2015;38:272-7.
203. Verway M, Bouttier M, Wang TT, Carrier M, Calderon M, An BS, Devemy E, McIntosh F, Divangahi M, Behr MA, White JH. Vitamin D induces interleukin-1 β expression: paracrine macrophage epithelial signaling controls M. tuberculosis infection. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):e1003407.
204. Vetter M, Neurath MF. Treatment Perspectives in Crohn's Disease. *Digestion.* 2018;98:135-142
205. Wang AH, Lam WJ, Han DY, Ding Y, Hu R, Fraser AG, Ferguson LR, Morgan AR. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Hum Immunol.* 2011;72:431-5
206. Wang J, Thingholm LB, Skiecevičienė J, Rausch P, Kummen M, Hov JR, Degenhardt F, Heinsen FA, Rühlemann MC, Szymczak S, Holm K, Esko T, Sun J, Pricop-Jeckstadt M, Al-Dury S, Bohov P, Bethune J, Sommer F, Ellinghaus D, Berge RK, Hübenthal M, Koch M, Schwarz K, Rimbach G, Hübbe P, Pan WH, Sheibani-Tezerji R, Häsler R³, Rosenstiel P, D'Amato M, Cloppenburg-Schmidt K, Künzel S, Laudes M, Marschall HU, Lieb W, Nöthlings U, Karlsen TH, Baines JF, Franke A. Genome-wide association analysis identifies variation in vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota. *Nat Genet.* 2016;48:1396-1406
207. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL; Fellermann, K.; Stange, E. F. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut.* 2004;53:1658–1664
208. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:18129-34.

209. Winter RW, Collins E, Cao B, Carrellas M, Crowell AM, Korzenik JR. Higher 25-hydroxyvitamin D levels are associated with greater odds of remission with anti-tumour necrosis factor- α medications among patients with inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;45:653-659.
210. White JH. Vitamin D deficiency and the pathogenesis of Crohn's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;175:23-28
211. Williams AD, Korolkova OY, Sakwe AM, Geiger TM, James SD, Muldoon RL, Herline AJ, Goodwin JS, Izban MG, Washington MK, Smoot DT, Ballard BR, Gazouli M, M'Koma AE. Human alpha defensin 5 is a candidate biomarker to delineate inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2017;12:e0189551. doi: 10.1371/journal.pone.0189551, PMID: 29211779
212. Wyant T, Fedyk E, Abhyankar B: An Overview of the Mechanism of Action of the Monoclonal Antibody Vedolizumab. *J Crohns Colitis.* 2016;10:1437-1444.
213. Xia Y, Chen H, Xiao H, Yang J, Li Z, Wang Y, Yang T, Wang B. Immune regulation mechanism of vitamin D level and IL-17/IL-17R pathway in Crohn's disease. *Exp Ther Med.* 2019;17:3423-3428.
214. Yang L, Weaver V, Smith JP, Bingaman S, Hartman TJ, Cantorna MT. Therapeutic effect of vitamin d supplementation in a pilot study of Crohn's patients. *Clin Transl Gastroenterol.* 2013;4:e33. doi: 10.1038/ctg.2013.1.
215. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol.* 2000;164:4878-82
216. Ye L, Lin Z, Liu J, Cao Q. Vitamin D Deficiency Is Associated with Endoscopic Severity in Patients with Crohn's Disease. *Gastroenterol Res Pract.* 2017:4869718. doi: 10.1155/2017/4869718. Epub 2017 Nov 16.
217. Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, Goleva E. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol.* 2012;188:2127-35
218. Zhao H, Zhang H, Wu H, Li H, Liu L, Guo J, Li C, Shih DQ, Zhang X, Protective Role of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. *BMC Gastroenterol.* 2012;30:12:57.
219. Zhou L, Braat H, Faber KN, Dijkstra G, Peppelenbosch MP. Monocytes and their pathophysiological role in Crohn's disease. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:192-202

Verwendete Internetseiten:

www.vitalstoff-lexikon.de/ Zugriff am 24.06.2018

www.chronisch-entzuendliche-erkrankungen.de/morbus-crohn/ Zugriff am 17.12.2017

<https://pictures.doccheck.com/de/photo/6839-vitamin-d-bildung-schema>

Zugriff am 17.12.2017

https://www.onmeda.de/naehrstoffe/vitamin_d.html Zugriff am 24.06.2018

<https://www.dgvs.de> Zugriff am 24.07.2018

<https://www.ecco-ibd.eu/index.php/publications/ecco-guidelines-science.html>

Zugriff am 25.07.2018

<http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/021-004.html> Zugriff am 25.07.2018

<http://www.dgvs.de/leitlinien/> Zugriff am 25.07.2018

8. Anhang

a. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung aktiver inflammatorischer Wege bei Homöostase und CED	4
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Mitglieder der NOD-like Rezeptor Familie.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mechanismen der Funktion von NOD2	7
Abbildung 4: Mutiertes <i>NOD2</i> ist nicht in der Lage die Aktivität des TLR2 zu hemmen	8
Abbildung 5: Aktivierung und Initiierung des Abbaus von Vitamin D ₃	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut. Eigene Darstellung.....	24
Abbildung 7: Schema der Zellstimulationen.....	26
Abbildung 8: IL-1 β mRNA Expression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus HC und MC-Patienten.....	35
Abbildung 9: IL-6 Genexpression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus HC und MC-Patienten	37
Abbildung 10: TNF- α mRNA Expression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus HC und MC-Patienten.....	38
Abbildung 11: IL-10 Genexpression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus HC und MC-Patienten.....	41
Abbildung 12: Vergleich der Genexpressionsänderung von IL-1 β in PBMCs aus HC und MC-Patienten mit und ohne Vitamin D.	42
Abbildung 13: Vergleich der Genexpressionsänderung von IL-6 in PBMCs aus HC und MC-Patienten mit und ohne Vitamin D.	44
Abbildung 14: Vergleich der Genexpressionsänderung von TNF- α in PBMCs aus HC und MC-Patienten mit und ohne Vitamin D.....	45
Abbildung 15: Vergleich der Genexpressionsänderung von IL-10 in PBMCs aus HC und MC-Patienten mit und ohne Vitamin D.	47
Abbildung 16: IL-1 β mRNA Expression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus Probanden mit <i>NOD2</i> -Wildtyp (WT) und Probanden mit homo- und heterozygotem <i>NOD2</i> -Mutationsstatus (MT).....	48
Abbildung 17: IL-6 mRNA Expression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus WT und MT	49
Abbildung 18: IL-10 mRNA Expression Expression und Wirkung von Vitamin D in PBMCs aus WT und MT.....	50
Abbildung 19: Effekt von Vitamin D auf die Sekretion von IL-6 bei PBMCs aus HC und MC-Patienten	52
Abbildung 20: Effekt von Vitamin D auf die Sekretion von IL-10 bei PBMCs aus HC und MC-Patienten.....	53
Abbildung 21: Effekt von Vitamin D auf die Sekretion von TNF- α bei PBMCs aus HC und MC-Patienten.....	55

Abbildung 22: Effekt von Vitamin D auf die Sekretion von IFN- γ bei PBMCs aus HC und MC-Patienten.....	56
Abbildung 23: Fließschema zur Erläuterung der Kernergebnisse aus den Untersuchungen zum Zytokinprofil aus HC und MC.....	58
Abbildung 24: Fließschema zur Erläuterung der Kernergebnisse aus den Untersuchungen zur Vitamin D Co-Stimulation.....	65

b. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Montreal-Klassifizierung von Morbus Crohn nach Silverberg et al. (2005)	2
Tabelle 2: Eingesetzte Materialien und Geräte	19
Tabelle 3: Chemikalien und Substanzen	20
Tabelle 4: Verwendete Medien	21
Tabelle 5: Verwendete Kits.....	21
Tabelle 6: Verwendete human-spezifische Taqman TM -Genexpression-Assays.....	21
Tabelle 7: Primer für <i>NOD2</i> -Genotypisierung.....	22
Tabelle 8: Daten der rekrutierten Morbus Crohn Patienten	22

c. Selbstständigkeitserklärung

Durch die folgende Unterschrift versichere ich, dass ich die Arbeit selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer, als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, welche wörtlich, oder sinngemäß aus anderen Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Flensburg, den 21.02.2021



.....
Hannes Hollborn

d. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. G. Lamprecht, Leiter der Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen am Zentrum für Innere Medizin der Universität Rostock, für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Abteilung durchführen zu können.

Weiterhin danke ich meinem Betreuer, Herrn Dr. med. habil. H. Schäffler, für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragenden Unterstützung bei der Konzeption der Arbeit und der schriftlichen Erstellung. Auch danke ich für die beständige Motivation im Verlauf der Arbeit.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. R. Jaster, Leiter des Forschungslabores Gastroenterologie, für die geduldige Betreuung meiner Arbeit in seinem Labor und die fachliche Expertise bei der praktischen Ausgestaltung dieser Arbeit. Die Hilfsbereitschaft im Verlauf zahlreicher Konsultationen und beim Erstellen der schriftlichen Arbeit verdient meinen ausdrücklichen Dank.

Ebenso danke ich Frau Dr. rer. nat. Sarah Rohde, Frau Dr. rer. hum. Luise Ehlers und BTA Frau Katja Bergmann, die mich durch die geduldige Einarbeitung, Hilfestellung und die Zuarbeit bei der Laborarbeit unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern für deren Rückhalt und ihre geduldige Ermutigung und Motivation bedanken. Besonders danke ich hierbei meiner Mutter für die Unterstützung bei der formalen Verbesserung und grammatikalischen Korrektur der schriftlichen Arbeit.

e. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Adresse Duburger Str. 76
 24939 Flensburg
Mobil 0160 97748767

E-Mail hannes.hollborn@web.de

Geburtsdatum, -ort 21. Mai 1993, Leipzig

Staatsangehörigkeit Deutsch

AKADEMISCHER WERDEGANG

2011 - 2019 Studium der Humanmedizin, Universität Rostock
 Auslandsemester, Universität Tromsø (2015)
2003 - 2011 Wilhelm-Ostwald-Gymnasium, Leipzig
 Leistungskurse: Mathematik, Chemie, Biologie

Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Notendurchschnitt 1,6)

PRAKTISCHE ERFAHRUNG

2014 Famulatur, Kardiologie Universität Leipzig
 Famulatur, Viszeralchirurgie Universität Rostock

2015 Studentische Assistenz, Kardiologie und Neurochirurgie,
 Universitätsklinikum Tromsø

2016 Famulatur, Praxis für Angiologie und Praxis für Allgemeinmedizin
 Sanitätsdienst, „Fusionfestival“ – Mecklenburg-Vorpommern

2018 PJ, Abschnitt Innere Medizin, Zentrum für Innere Medizin,
 Universitätsklinikum Rostock

2018 PJ, Abschnitt Chirurgie, Chirurgische Klinik und Klinik für Orthopädie
 und Traumatologie, Zuger Kantonsspital

2019 PJ, Abschnitt Anästhesie, Klinik für Anästhesie und operative
 Intensivmedizin, Diakonissenkrankenhaus Flensburg und St.
 Franziskus-Hospital Flensburg

2020 Arzt in Weiterbildung, Klinik für HNO - St. Franziskus-Hospital
 Flensburg

EHRENAMTLICHES ENGAGEMENT

2008 - 2011 Mitglied der DLRG, Abteilung Rettungsschwimmen

2017 Tandemprogramm der Universität Rostock

SPRACHKENNTNISSE

Deutsch (Muttersprache)
Englisch (Fließend)
Norwegisch (Fortgeschritten)
Spanisch (Gute Kenntnisse)
Französisch (Grundkenntnisse)

MITWIRKUNG AN DER FOLGENDEN PUBLIKATION:

Schäffler H, Rohde M, Rohde S, Huth A, Gittel N, Hollborn H, Koczan D, Glass Ä, Lamprecht G, Jaster R. *NOD2*- and disease-specific gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells from Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol.* 2018;24:1196-1205

VORTRAG:

Hollborn H, Müller S, Lamprecht G, Jaster R, Schäffler H. Einfluss von Vitamin D auf die Stimulierbarkeit von PBMCs aus M. Crohn Patienten.

71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie. 21. -24.09.2016